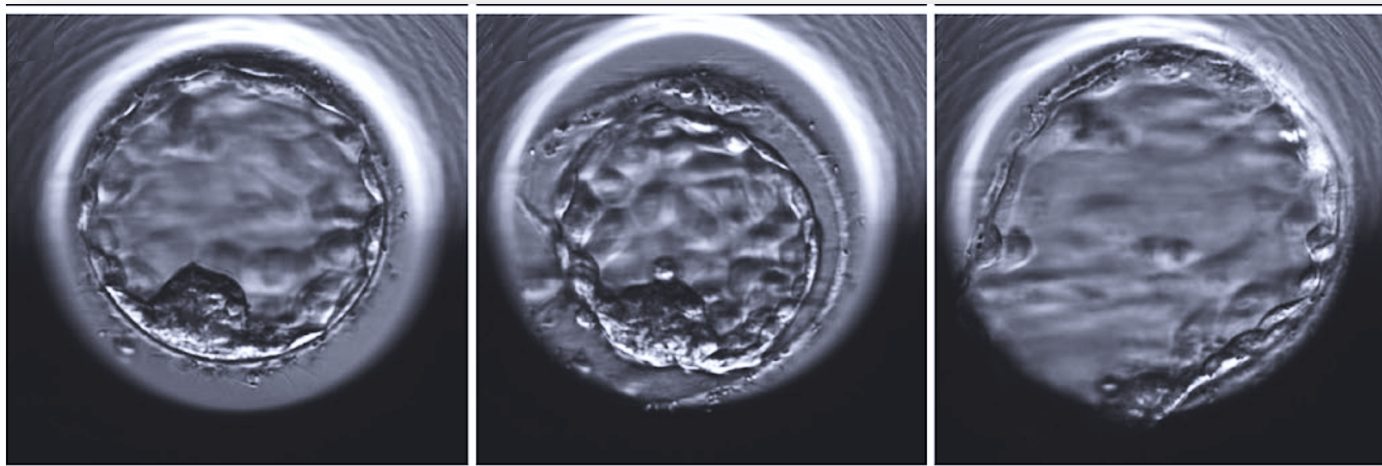




O impacto da eclosão assistida de embriões humanos nos resultados reprodutivos

Inês Lopes Figueiredo

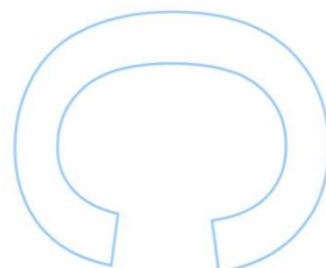
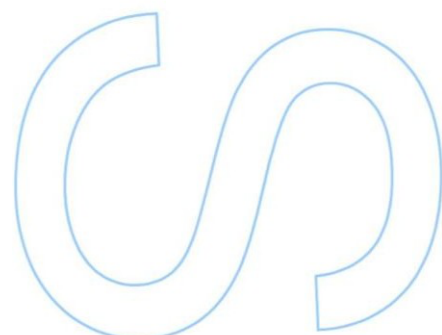
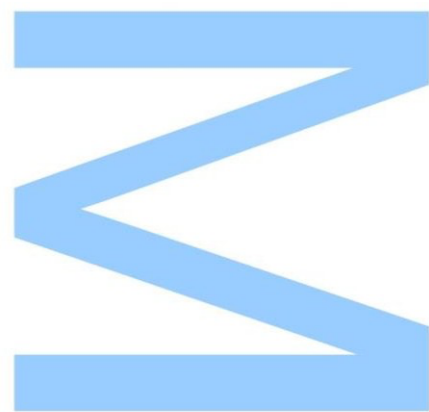
Mestrado em Biologia Celular e Molecular
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2021/2022

Orientador

Doutor Miguel Gallardo Molina
Embriologista Clínico, Ginemed-Lisboa

Coorientador

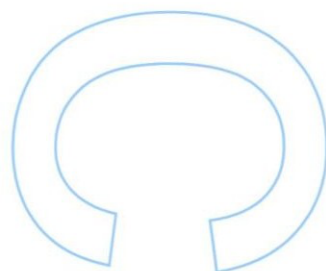
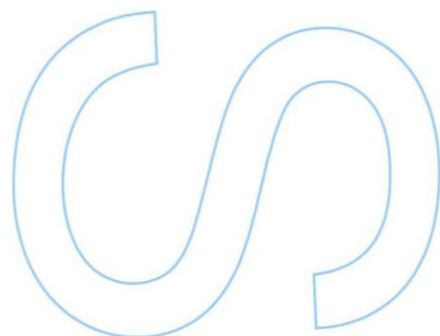
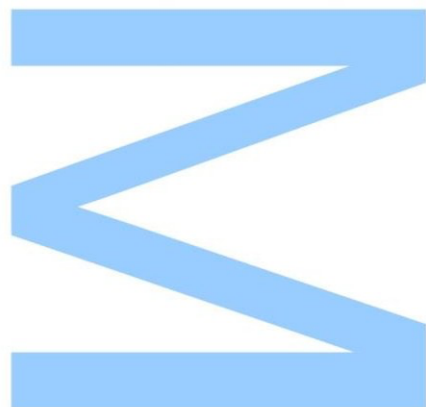
Professor Doutor Vasco Almeida
Professor Auxiliar, FCUP



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, 14/11/2022



Declaração de Honra

Eu, Inês Lopes Figueiredo, inscrita no Mestrado em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U. Porto, que o conteúdo do presente relatório de estágio, reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar este relatório de estágio, declaro, ainda, que o mesmo é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados no presente relatório de estágio quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Inês Lopes Figueiredo

Porto, 23 de setembro de 2022

Agradecimentos

Foram várias as pessoas que marcaram a realização deste trabalho de pesquisa e que contribuíram para a experiência tão enriquecedora, que foi este estágio curricular no âmbito da Reprodução Humana Assistida.

Aos meus pais, à minha irmã e ao Henrique, por me incentivarem sempre a seguir os meus sonhos, por me lembrarem sempre de manter o foco nos meus objetivos e pela vossa ajuda sempre oportuna. O vosso apoio incondicional foi essencial para que eu pudesse concluir mais uma etapa.

Aos amigos que a Faculdade de Ciências do Porto me trouxe, em especial à Rita e à Filipa pelo vosso incessante apoio, paciência e companheirismo. Aos meus amigos Bruno, Eunice e Catarina por me motivarem na reta final deste trabalho e serem a minha tão necessária fonte de descompressão.

Ao meu orientador Doutor Miguel Gallardo, pelo esforço despendido na orientação deste trabalho e pela confiança crescente que me foi depositando. Pela constante partilha de conhecimento, por toda a disponibilidade e pela oportunidade de estagiar no laboratório da clínica Ginemed, que tanto contribuiu para a minha formação nesta área científica.

Ao meu coorientador Professor Doutor Vasco Almeida, por me ter instruído na área de Biotecnologia da Reprodução Assistida durante a licenciatura e no âmbito do Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Por ter sido o primeiro a possibilitar a minha entrada nesta área que tanto prezo.

A toda a equipa Ginemed, por desde o primeiro dia me integrarem como um elemento da equipa, pela simpatia, boa disposição e por todo o conhecimento que me foi transmitido. Foi um prazer observar a dedicação com que trabalham, sempre com sensibilidade para com os colegas de trabalho e para com os utentes.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, que me acolheram ao longo dos últimos cinco anos, por tornarem a minha formação em Biologia Celular e Molecular num processo tão aliciante.

Resumo

A infertilidade é atualmente uma das principais dificuldades que os casais enfrentam, afetando cerca de 15% da população mundial. As tecnologias de Reprodução Humana Assistida devem ser encaradas como um interveniente terciário que contribui para a realização e concretização do desejo de paternidade. Apesar da significativa progressão das taxas de sucesso reprodutivas nesta área, ainda há muito por aprender de modo a aperfeiçoar o tratamento e seguimento dos pacientes, bem como solucionar os casos de infertilidade mais desafiantes.

Para além das técnicas de fertilização que são utilizadas no campo da tecnologia de reprodução humana assistida, têm sido praticadas diversas técnicas complementares com o intuito de beneficiar as taxas reprodutivas.

É do conhecimento científico atual, que para se conseguir uma correta implantação e obter uma gravidez bem-sucedida, o embrião precisa de se libertar da zona pelúcida, num processo chamado eclosão. Especula-se ainda, que a ausência de eclosão natural possa ser uma das causas de fracasso na implantação após a criopreservação, um processo que está relacionado com o endurecimento da zona pelúcida.

As técnicas de eclosão assistida emergiram com o objetivo de potenciar a implantação do embrião no endométrio, ao evitar o gasto de energia acrescido que é necessário para que ocorra a eclosão espontânea do embrião.

Inicialmente, surgiram os métodos mecânicos, posteriormente os químicos e, mais recentemente, a eclosão induzida por laser. Atualmente, o recurso ao equipamento com sistema de laser infravermelho, constitui o método *gold standard* de eclosão assistida utilizada em contexto clínico. A sua manipulação permite a completa perfuração da zona pelúcida ou o seu desbaste.

Apesar da eclosão assistida via laser ser amplamente utilizada devido à sua alta precisão, pode causar danos aos embriões e até comprometer o desfecho reprodutivo. Desta forma, é importante estabelecer uma abordagem criterial fiável para a toma de decisões clínicas e para a prática deste método que, apesar das suas aparentes vantagens, permanece um procedimento invasivo.

Adicionalmente, já foi demonstrado que os eventos de colapso embrionário são considerados um marcador negativo de implantação. No entanto, estudos recentes revelaram que a realização de eclosão assistida em blastocistos colapsados, antes da sua transferência intrauterina, pode vir a ser utilizada como forma de obter melhores resultados reprodutivos.

O presente estudo constitui uma primeira análise retrospectiva, em que se recolheu informação da base de dados da clínica Ginemed, relativa a 354 ciclos de mulheres submetidas à sua primeira transferência de embriões criopreservados. Estes dados foram analisados estatisticamente de forma a comparar diferentes parâmetros laboratoriais e resultados reprodutivos, tanto de casos em que se realizou eclosão assistida, como de casos em que não se utilizou esta técnica.

Os resultados obtidos, revelam a ausência de influência estatisticamente significativa da prática de eclosão assistida nos resultados reprodutivos, reforçando que esta técnica aparenta ser vantajosa, apenas quando aplicada meticulosa a um grupo específico de pacientes.

Este trabalho reúne ainda, uma segunda análise retrospectiva, que contou com 51 transferências de embriões criopreservados e um total de 78 embriões transferidos. O tratamento estatístico destes dados teve como intuito avaliar o impacto do colapso embrionário nos resultados reprodutivos. Os dados demonstraram a ausência de qualquer efeito ou correlação com significância estatística, entre o evento de colapso e os parâmetros reprodutivos analisados.

Palavras-chave: Eclosão assistida, Colapso embrionário, Zona pelúcida, Reprodução Humana Assistida, Transferência embrionária, Qualidade embrionária, Criopreservação.

Abstract

Infertility is currently one of the main challenges couples face, roughly affecting 15% of the world's population. Assisted Reproductive Technologies should be seen as a third-party intervener to the realization and fulfillment of the parenthood desire. Despite the substantial increase in reproductive success rates in this field, there is still much to be learned in order to improve the treatment and follow-up of patients and solve the most challenging infertility cases.

Thus, in addition to the fertilization techniques that are used in assisted human reproduction, several complementary procedures have been implemented to benefit reproductive rates.

For instance, the current scientific knowledge indicates that to achieve proper implantation and a successful pregnancy, the embryo needs to free itself from the zona pellucida through a process commonly known as hatching. There is further speculation that the absence of natural hatching may be a possible cause of implantation failure after cryopreservation, a process that is allied to the hardening of the zona pellucida.

Hence, several assisted hatching techniques have emerged aiming to enhance embryo implantation, by avoiding the additional energy consumption involved in the spontaneous hatching of the embryo.

Initially, mechanical methods emerged followed by chemical procedures and more recently, laser-induced hatching. Currently, the use of equipment with infrared laser system is the gold standard method of assisted hatching for clinical applications, enabling the complete drilling or thinning of the zona pellucida.

Nevertheless, laser assisted hatching, that has been widely used due to its high precision, can still cause damage to the embryos, and even compromise the reproductive outcome. Therefore, it is imperative to establish a reliable criterial approach for clinical decision making, and for the practice of this method, which despite its seemingly advantages, remains an invasive procedure.

Additionally, it has been demonstrated that embryonic collapse events are considered a negative marker for implantation. However, recent studies have revealed that performing assisted hatching on collapsed blastocysts prior to intrauterine transfer may potentially improve reproductive outcomes.

The present study consists of a first retrospective analysis, in which information was gathered from the Ginemed clinic database, concerning 354 cycles of women who underwent their first cryopreserved embryo transfer. Data was statistically analyzed in

order to compare several laboratorial parameters and the reproductive results of assisted hatching and non-assisted hatching cases.

These results revealed the absence of a statistically significant influence of the assisted hatching practice on the reproductive outcome, reinforcing that this technique appears to be advantageous only when applied meticulously to a targeted group of patients.

This study also includes a second retrospective analysis, which included 51 cryopreserved embryo transfers and a total of 78 transferred embryos. The statistical treatment of data was intended to assess the impact of embryo collapse on reproductive results. Results showed no statistically significance effect or correlation between the collapse episodes and the reproductive parameters evaluated.

Keywords: Assisted Hatching, Embryo collapse, Zona pellucida, Assisted Reproductive Technologies, Embryo transfer, Embryo quality, Cryopreservation.

Índice

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	5
Lista de Abreviaturas.....	9
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas.....	11
Capítulo I – Componente de Estágio	1
Introdução	1
1. Infertilidade	1
1.1. A Infertilidade Conjugal e o seu Impacto na Sociedade	1
1.2. Causas da Infertilidade e o seu Diagnóstico	2
2. As técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA).....	4
2.1. Inseminação Intrauterina (IIU).....	4
2.2. Fertilização <i>In Vitro</i> Convencional (FIV)	5
2.3. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)	6
3. O Desenvolvimento Embrionário e a Cultura In Vitro	8
4. A Transferência Embrionária (ET)	9
5. A Criopreservação de Embriões	11
6. A Eclosão Assistida	13
6.1. Função e Fisiologia da Zona Pelúcida (ZP)	13
6.2. A Eclosão <i>in vivo</i>	14
6.3. O Surgimento da Eclosão Assistida em RHA	15
6.4. As Diferentes Técnicas de Eclosão assistida	16
6.4.1. As Técnicas Mecânicas de Eclosão assistida	17
6.4.2. As Técnicas Químicas de Eclosão assistida	18

6.4.3.	Aparecimento do Laser na técnica de Eclosão Assistida	19
6.4.4.	A Incerteza na Aplicação da Técnica Atual de Eclosão Assistida	21
6.5.	Eclosão assistida em Embriões Colapsados	23
Capítulo II – Componente de Investigação		24
1.	Objetivos	24
2.	Materiais e Métodos	25
2.1.	Dimensão do estudo e elegibilidade dos intervenientes.....	25
2.2.	Avaliação da Qualidade Embrionária.....	26
2.3.	Identificação de um Evento de Colapso	28
2.4.	Recolha e Seleção dos dados retrospectivos.....	29
2.5.	Seleção dos resultados reprodutivos.....	30
2.6.	Análise estatística	30
3.	Resultados.....	31
3.1.	Prática da técnica de eclosão assistida	31
3.2.	Eclosão assistida em embriões colapsados	33
3.2.1.	Caraterísticas da população amostral	33
3.2.2.	Resultados laboratoriais e clínicos das transferências embrionárias	35
3.2.3.	Colapso embrionário nos resultados reprodutivos	37
3.2.4.	Fatores relacionados com o colapso embrionário.....	38
4.	Discussão	39
5.	Conclusão.....	46
6.	Considerações Finais.....	47
Referências Bibliográficas		49

Lista de Abreviaturas

ASEBIR - **A**sociación para el **E**studio de La **B**iólogía de la **R**eproducción

CCO - Complexo *cumulus* –*coroa radiata* – oócito

CNPMA - **C**onselho **N**acional de **P**rocriação **M**edicamente **A**ssistida

DET - Transferência de 2 embriões (**D**ouble **E**mbryo **T**ransfer)

ECO + - **E**cografia positiva

ESHRE - Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (**E**uropean **S**ociety of **H**uman **R**eproduction and **E**mbryology)

ET - Transferência embrionária (**E**mbryo **T**ransfer)

FIV - **F**ertilização *In Vitro* clássica

hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana (**H**uman **C**horionic **G**onadotropin)

ICSI - Microinjeção intracitoplasmática (**I**ntracytoplasmic **S**perm **I**njection)

IUI - Inseminação intrauterina

MCI - **M**assa **C**elular **I**nterna

MEV – **M**icroscópio **E**letrónico de **V**arrimento

OMS - **O**rganização **M**undial de **S**aúde

PGT - Teste Genético Pré-implantação (***P**reimplantation **G**enetic **T**esting*)

PGT-SR - Teste Genético Pré-implantação para Rearranjos Estruturais cromossómicos

PGT-A - Teste Genético Pré-implantação para Aneuploidias

PGT-M - Teste Genético Pré-implantação para doenças Monogénicas

RHA - **R**eprodução **H**umana **A**ssistida

SET - Transferência de um único embrião (**S**ingle **E**mbryo **T**ransfer)

TE - **T**rofoectoderme

TEC - **T**ransferência de **E**mbriões **C**ongelados

ZP - **Z**ona **P**elúcida

β -hCG – β Gonadotrofina Coriônica Humana

Lista de Figuras

Figura 1 – Ilustração sequencial de uma ICSI.

Figura 2 – Desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Figura 3 – Superfície externa da ZP de um oócito maduro durante a fertilização.

Figura 4 – Representação sequencial da Dissecção Parcial da ZP.

Figura 5 – Eclosão Assistida por etapas, utilizando solução ácida de *Tyrode*.

Figura 6 – Os três métodos mais utilizados para a Eclosão Assistida por meio de laser.

Figura 7 – Embriões manipulados de acordo com 4 grupos experimentais.

Figura 8 – Embriões em fase de blastocisto.

Figura 9 – Exemplos de blastocistos com diferentes graus de contração.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sistema de classificação segundo o consenso de Istambul para blastocistos.

Tabela 2 – Características da população e análise estatística do possível impacto da prática da técnica de eclosão assistida, nos resultados reprodutivos, nessa população.

Tabela 3 – Características da população: as variáveis com potencial efeito no colapso embrionário e respetivos resultados laboratoriais.

Tabela 4 – Transferências embrionárias e os respetivos parâmetros laboratoriais e resultados clínicos/reprodutivos.

Tabela 5 – Impacto do evento de colapso embrionário nos resultados reprodutivos após a transferência embrionária.

Tabela 6 – Comparação de parâmetros laboratoriais, entre pacientes com pelo menos um blastocisto colapsado, e pacientes sem blastocistos colapsados.

Capítulo I – Componente de Estágio

Introdução

1. Infertilidade

A infertilidade clínica é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a incapacidade de um casal conseguir uma gravidez, após um ano de relações sexuais regulares sem proteção. Atualmente esta é considerada um problema de saúde pública [7].

1.1. A Infertilidade Conjugal e o seu Impacto na Sociedade

A infertilidade conjugal tem permanecido um tabu social e uma causa de sofrimento psíquico para o casal desde os tempos mais remotos e, apesar da evolução do pensamento e da ciência moderna, o desejo pela paternidade mantém-se [8, 9]. Desta forma, é perceptível que a capacidade de o ser humano de gerar descendência integra não só um fator biológico, mas também atende ao elemento social. O peso da infertilidade é agravado pelo contexto sociocultural, em que a maternidade é vista como algo imperativo [10].

A OMS classifica e, ainda, divide a infertilidade em duas vertentes: a infertilidade primária e a infertilidade secundária. A infertilidade primária ocorre quando a mulher nunca desenvolveu uma gravidez, com nado vivo ou não, satisfazendo todos os critérios do diagnóstico de infertilidade. Já a infertilidade secundária, consiste na incapacidade de uma mulher alcançar uma gravidez clínica, quando pelo menos um dos elementos do casal, iniciou uma gravidez clínica anteriormente [11].

Esta distinção é de extrema importância no contexto clínico pois contribui para uma melhor avaliação e consequentemente para a escolha e aplicação do tratamento de Reprodução Humana Assistida (RHA) mais adequado.

A RHA, de uma forma simplificada, consiste num conjunto de procedimentos que permitem a manipulação *in vitro* de óocitos, espermatozoides e embriões, com a finalidade de alcançar uma gravidez viável em casos de infertilidade masculina, feminina ou ambas [1].

A terminologia e definições utilizadas nos cuidados de fertilidade, infertilidade e RHA são essenciais. A forma como alguns termos são definidos tem impacto na sua aceitação e compreensão, não só pelos pacientes e profissionais de saúde, mas também pelo público e legisladores, o que pode afetar a forma como a medicina reprodutiva é exercida e aceite a nível nacional [11].

A nível global, a infertilidade afeta cerca de 15% dos casais que se encontram em idade fértil, sendo que, países em desenvolvimento estão normalmente associados a uma taxa de infertilidade superior à que se verifica em países desenvolvidos [12]. Em contrapartida, o aumento da esperança média de vida associada ao avanço das tecnologias de RHA dos países desenvolvidos, revelou uma tendência para idades parentais mais elevadas e o consequente decréscimo da fertilidade [13].

Na Europa, segundo os registos mais recentes da *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) [14], o número de ciclos de tratamento continua a aumentar, assim como o número de recém nascidos provenientes das tecnologias de RHA, sendo que, no ano de 2017 foram registados 940 503 e 198 215, respetivamente. Em Portugal, o relatório realizado em 2021 pelo Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA) revelou que em 2018 nasceram 2733 crianças como resultado do uso das várias técnicas de RHA, o que representa 3,1% do número total de nascimentos do país nesse ano [15].

1.2. Causas da Infertilidade e o seu Diagnóstico

O estudo dos fatores que levam à infertilidade tem sido essencial para executar um diagnóstico correto e consequentemente realizar a melhor abordagem terapêutica possível.

Os fatores de infertilidade são, normalmente, categorizados em patológicos, não patológicos e relacionados com o estilo de vida. A causa da infertilidade pode ser feminina e/ou masculina, ou ainda de carácter idiopático, caso não seja encontrada uma causa aparente que clarifique a infertilidade do casal, sendo este um diagnóstico de exclusão.

Os fatores patológicos da infertilidade feminina podem estar associados a disfunções ovulatórias, a fatores tubo-peritoneais, ao fator cervical, ao fator uterino e ainda, a causas genéticas. As patologias ovulatórias representam aproximadamente 25% das principais causas da infertilidade feminina [16], enquanto que, o fator tubo-peritoneal atinge cerca de 30% a 35% da população infértil feminina [17]. É de realçar a endometriose, visto que esta patologia afeta 10% a 15% das mulheres em idade

reprodutiva e que 40% a 50% destas são inférteis [18]. Por outro lado, o fator cervical desempenha um papel minoritário na infertilidade e o seu diagnóstico através da avaliação do muco cervical é um método pouco rigoroso [19].

A infertilidade masculina inclui uma série de fatores patológicos que podem possuir cariz não obstrutivo, obstrutivo e ejaculatório [20]. Dentro dos fatores não obstrutivos enquadram-se as alterações hormonais, as anomalias genéticas, os fatores imunológicos, os traumas testiculares, a criptorquidia e a causa mais frequente de infertilidade masculina que é o varicocele, afetando cerca de 40% dos homens [20, 21]. Entre os fatores não patológicos da infertilidade, é de referir a frequência das relações sexuais e a periodicidade da mesma. [22].

Não obstante, a idade é também um fator não patológico da infertilidade a ter em consideração. Como mencionado anteriormente, atualmente, é cada vez mais trivial o casal procurar por estabilidade profissional e económica antes de procriar, o que se traduz num adiamento da maternidade [13].

A idade feminina é um principal agente na sua infertilidade, dado que, a fertilidade diminui significativamente de forma desproporcional consoante o avanço da idade (> 35 anos), uma vez que o número de óocitos é limitado e a reserva ovárica vai diminuindo a cada ciclo [23].

Ademais, a idade avançada da procriação, juntamente com o estilo de vida do mundo moderno, oferece uma ampla margem de oportunidade para que o estilo de vida e as perturbações genéticas possam intervir e prejudicar a fertilidade [24].

Existe também um decréscimo na fertilidade masculina associada ao avanço da idade paterna. Contudo, tanto os processos fisiológicos normais como os fatores ambientais, podem ser responsabilizados pelos efeitos do envelhecimento no sistema reprodutor masculino, o que aumenta a complexidade da perceção de quais os mecanismos exatos subjacentes ao aumento da infertilidade masculina com a idade [25, 26].

O estilo de vida e os hábitos do quotidiano têm também um grande impacto na fertilidade do ser humano. Diversos fatores de estilo de vida como a obesidade, a dieta, as alterações de foro psicológico, o tabagismo, o consumo de álcool, o consumo de drogas e a exposição a substâncias químicas e a poluentes ambientais, têm consequências para o desempenho reprodutivo do casal [27]. Deste modo, é importante nas primeiras instâncias de contacto com o paciente, avaliar o histórico reprodutivo de ambos os membros do casal para que se infira sobre qual a causa mais provável de infertilidade [28].

A análise da história reprodutiva do casal deve incidir sobre a duração da infertilidade atual, se há historial de infertilidade prévia, a existência ou não de descendência, todo

o histórico cirúrgico e patológico, os hábitos do quotidiano e ainda, a frequência das relações sexuais.

2. As técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA)

A evolução das técnicas no campo da tecnologia de reprodução humana assistida tem solucionado casos de infertilidade que em tempos eram considerados impossíveis de ultrapassar. Estes procedimentos incluem a fertilização *in vivo*, onde consta a inseminação intrauterina (IIU) e a fertilização *in vitro*. Esta última designa as técnicas que implicam a união dos gametas feminino e masculino em laboratório, como a fertilização *in vitro* clássica (FIV) e a injeção intracitoplasmática (ICSI) [11].

É de realçar, que independentemente de a origem da infertilidade ser masculina ou feminina, tanto a FIV como a ICSI são acompanhadas de um ciclo de estimulação ovárica inicial, seguida de uma punção folicular e o subsequente processamento da amostra seminal.

2.1. Inseminação Intrauterina (IIU)

A IIU é uma técnica que surgiu em 1962, sendo que, atualmente a sua utilização é bastante recorrente nos laboratórios de RHA [29]. Este procedimento recorre ao auxílio de um cateter de inseminação para depositar uma amostra seminal no interior da cavidade uterina feminina [30].

Após a recolha da amostra seminal no próprio dia da IIU, esta deve ser processada em laboratório de forma a aprimorar ao máximo a sua qualidade. Este processamento consiste na separação por densidade através de gradientes de concentração, ressuspensão em meio de cultura e *swim-up*. Este tratamento permite a remoção do plasma seminal e o posterior aproveitamento do sobrenadante, que é aspirado para uma seringa, sendo seguidamente agregado ao cateter de inseminação [31, 32].

A IIU pode ser realizada em mulheres com ciclo menstrual normal ou em mulheres que tenham sido submetidas a um ciclo com estimulação ovárica. No caso da estimulação dos ovários, o objetivo é induzir a ovulação através da administração de uma hormona análoga à Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) de forma a obter maior quantidade de folículos maduros e conseguir coordenar o horário da inseminação com o da ovulação [33, 34].

Para além da hCG, a administração de progesterona é também utilizada para aumentar as taxas de sucesso de implantação, ao permitir uma maior receptividade do endométrio [35].

A IIU é um procedimento menos invasivo, menos dispendioso e mais simples quando comparado às técnicas de FIV e de ICSI. Assim, a IIU é considerada como sendo um tratamento de primeira linha e é utilizada quando existe um bom prognóstico de gravidez. Esta técnica é também indicada como uma primeira abordagem para solucionar casos de infertilidade idiopática [36]. Adicionalmente, outra vantagem que esta oferece é a redução do trajeto que os espermatozoides percorrem até ao oócito, permitindo assim ultrapassar qualquer barreira do canal cervical e aumentar a probabilidade de fecundação [30].

Os fatores de infertilidade que são indicados para a realização de uma IIU são essencialmente o fator cervical, o fator masculino leve, as disfunções ejacutórias, a presença de um casal serodiscordante, as disfunções ovulatórias e a endometriose leve [37].

Em contrapartida, esta técnica não está indicada para mulheres portadoras de qualquer patologia que comprometa a capacidade da fecundação decorrer num meio natural. De facto, apesar da constante evolução da IIU nos últimos 50 anos, as taxas de sucesso reprodutivo continuam a ser menores comparativamente às observadas com outros métodos de RHA [38].

2.2. Fertilização *In Vitro* Convencional (FIV)

Mais de quatro décadas após o nascimento de Louise Brown, o primeiro “bebé proveta”, é visível a forma como o campo da RHA contribuiu para a melhor compreensão e preservação da fertilidade humana, tanto *in vivo* como *in vitro* [39].

A abordagem convencional da FIV, para um casal infértil, é a hiperestimulação controlada dos ovários, onde o crescimento e a maturação folicular é estimulada de forma a maximizar a produção de oócitos que são recuperados em cada ciclo através da punção folicular [40].

Este procedimento consiste em recuperar complexos *cumulus –coroa radiata – oócito* (CCO) diretamente do ovário, por aspiração com auxílio de uma agulha transvaginal. De facto, a FIV envolve uma sequência de eventos que se inicia com a administração exógena de gonadotrofinas para estimular o desenvolvimento folicular, posterior recolha através da punção, fertilização dos oócitos com o esperma *in vitro*, cultura dos embriões obtidos e transferência embrionária [41].

No entanto, pode ser realizado um ciclo natural de FIV, isto é, o paciente é submetido a um ciclo não estimulado, com o mínimo ou sem medicação previamente à recuperação de oócitos e à transferência uterina de um único embrião. Este procedimento pode ser utilizado no contexto de um doente que não tolera ou prefere um estímulo ovárico mínimo devido a efeitos secundários ou restrições financeiras [40].

Assim, o sucesso de um ciclo de FIV implica o equilíbrio entre a otimização da recuperação de óvulos para criar embriões de alta qualidade com o fim da transferência uterina, enquanto tenta minimizar a exposição da paciente aos riscos de estimulação excessiva dos ovários.

Um ciclo de FIV pode inesperadamente falhar e não ser possível obter fertilização. Este facto pode estar relacionado com o protocolo hormonal de estimulação utilizado, ou na maioria dos casos, ser um defeito na interação espermatozoide-ovócito [42].

2.3. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

A união espermatozoide-ovócito que leva à subsequente fertilização, é um processo biológico altamente complexo que envolve interação célula-célula, reconhecimento, transmissão de sinal, fusão de membrana, ativação, remodelação da cromatina e outros componentes moleculares. Desta forma, apesar de a ideia de contornar toda esta complexidade e simplesmente forçar a introdução do espermatozoide no ovócito parecer questionável, tem sido um procedimento recorrente e eficaz nos laboratórios de RHA [40].

A ICSI foi introduzida no início dos anos 90 como um dos mais surpreendentes avanços na tecnologia da reprodução assistida. Após a sua introdução, a técnica foi rapidamente incorporada na rotina de prática clínica dos centros de fertilidade pelo mundo inteiro. A ICSI surgiu como sendo a técnica que permitiu a proporção 1:1 dos gametas com uma taxa de fertilização consistente [43].

As várias etapas da ICSI convencional estendem-se desde a desnudação do oócito, à imobilização do espermatozoide até à injeção do espermatozoide no ovócito (Figura 1). De realçar, que com base nos princípios biológicos do desenvolvimento de oócitos, apenas os oócitos maduros são injetados regularmente na ICSI, sendo os oócitos imaturos geralmente descartados. No entanto, a utilização de oócitos imaturos pode aumentar o número de embriões disponíveis. Esta questão é gerida de forma diferente nos vários laboratórios clínicos, mas a possibilidade de utilizar oócitos imaturos na prática diária pode ser vantajosa [44].

Existem atualmente várias indicações para a realização da ICSI, tornando-a o método de fertilização mais popular em todo o mundo. A principal utilização dessa técnica ocorre quando o fator de infertilidade se prende estritamente com o fator masculino.

Porém, as indicações para a utilização da ICSI têm evoluído no sentido de incluir casos de fatores não masculinos, tais como a fertilização repetidamente falhada com FIV convencional, o baixo número de oócitos recuperados na punção e a redução da contaminação genética de embriões destinados a serem testados para doenças hereditárias através do Teste Genético Pré-implantação (PGT) [43].

Adicionalmente, a ICSI provou ser útil para a fertilização de oócitos previamente criopreservados devido ao endurecimento da zona pelúcida aquando da descongelação.

Um estudo recente, demonstrou que no que diz respeito às taxas de nascimentos vivos, a ICSI não oferece qualquer vantagem sobre a FIV convencional em casais que não apresentem fatores de infertilidade masculina. Assim, recomenda-se a utilização da FIV convencional como método de preferência em pacientes que não tenham fator de infertilidade masculina, de forma a economizar e a utilizar um método menos invasivo e mais próximo daquilo que é a fertilização natural [45].

Estudos revelam que a utilização de uma “rescue” ICSI pode ser uma opção viável para o resgate de ciclos de FIV agravados por falha total, ou quase total, de fertilização. Este procedimento deve ser reservado para situações em que a qualidade dos oócitos não aparente ser o fator de falha na fertilização e deve ser realizado o mais cedo possível após a comprovação dessa condição [42].



Figura 1. Ilustração sequencial de uma ICSI. Em primeiro lugar, o oócito é estabilizado com a pipeta de fixação (à esquerda) e o espermatozoide selecionado é aspirado e mantido na extremidade da pipeta de injeção (à direita). A injeção é realizada numa posição perpendicular ao glóbulo polar, para evitar danos no fuso acromático. Posteriormente, a pipeta de injeção penetra no oócito e, quando esta atinge o centro do oócito, a oolema rompe. No fim, com a pipeta de injeção o citoplasma do oócito é aspirado e reexpulso. Imagens propriedade da clínica Ginemed, Lisboa.

3. O Desenvolvimento Embrionário e a Cultura *In Vitro*

A fase de pré-implantação do embrião é um período altamente dinâmico durante o qual o embrião se desenvolve, passando de um oócito para um grupo de células metabolicamente ativas, predominantemente sob o seu próprio controlo genético, que se denomina por estágio de blastocisto. Uma série de eventos de desenvolvimento altamente coordenados ocorre num período de 4-5 dias.

Inicialmente, há ativação oocitária seguida pela primeira divisão celular, que ocorre cerca de 21h depois [46].

Subsequentemente, à medida que aumenta o número de divisões celulares, há uma ativação gradual do genoma embrionário. No terceiro dia de desenvolvimento, ocorre a compactação e no quinto dia há finalmente a formação do blastocélio seguida da diferenciação da massa celular interna (MCI) e da trofoectoderme (TE) (Figura 2) [46].

Assim, consoante o desenvolvimento e a diferenciação do embrião, vão surgindo diferentes exigências, que implicam uma regulação rigorosa das funções celulares embrionárias, tais como a homeostasia e o metabolismo.

Tendo em consideração que o principal fator que contribui para o aumento da taxa de gravidezes múltiplas é o número de embriões transferidos, atualmente, as clínicas de RHA operam no sentido de transferir menos embriões e primam antes, pela qualidade embrionária para obter melhores resultados reprodutivos. Este fator, tem levado a uma maior atenção aos meios e às condições da cultura *in vitro* [46]. Contudo, apesar da sua significância, é necessário definir qual será a composição do meio de cultura ideal para o embrião [47].

É igualmente importante ponderar e decidir entre a utilização de um meio sequencial ou de um meio contínuo. Os meios sequenciais pretendem adequar-se às exigências metabólicas do embrião com base na sua fase de desenvolvimento. Na prática, isto implica a utilização de dois meios de cultura distintos, sendo o primeiro meio utilizado entre o primeiro e o terceiro dia de desenvolvimento e o segundo utilizado desde o terceiro dia até ao quinto/sexto dia [48].

De facto, a necessidade de transferir os embriões de um meio para outro aumenta a probabilidade de danificar e submeter os embriões a condições de stress. Por este motivo, os meios contínuos são bastante práticos, dado que os embriões podem ser mantidos em cultura sem perturbações para se desenvolverem até ao quinto ou sexto dia, sendo particularmente adequados para a monitorização com sistemas de *time-lapse* [48].

Existem apreensões de que o uso de meio de cultura de uma forma prolongada possa resultar na acumulação de substâncias tóxicas embrionárias [49]. Porém, um estudo recente indica que os meios contínuos são equivalentes aos meios sequenciais em termos de resultados reprodutivos [48].

A introdução do equipamento de *time-lapse* para a cultura de embriões humanos permitiu a monitorização contínua dos embriões, facilitando a avaliação dos parâmetros de qualidade embrionária. Esta tecnologia foi capaz de solidificar os fatores de qualidade morfológicos e estáticos já estabelecidos, introduzindo potenciais novos marcadores dinâmicos de viabilidade baseados na morfologia e cinética da clivagem.

Este equipamento também proporciona o benefício de obter condições estáveis de cultura durante a avaliação, sendo um método clínico promissor para a refinar a avaliação da qualidade embrionária e para seleccionar o melhor embrião possível para a transferência embrionária [50].

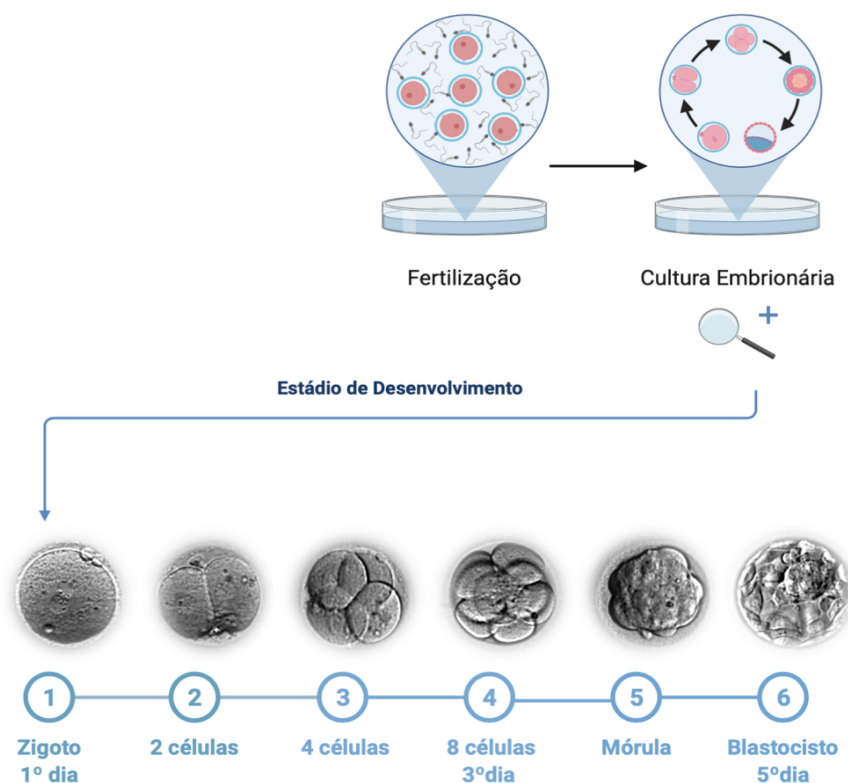


Figura 2. Desenvolvimento embrionário *in vitro*. Adaptado de [2]. Desenvolvido com recurso a BioRender.com.

4. A Transferência Embrionária (ET)

A transferência de embriões (ET) é o evento final e culminante de um ciclo de fertilização *in vitro*. Ainda que a má qualidade do embrião ou uma recetividade uterina insuficiente possam ser responsáveis pelo fracasso na implantação, a própria técnica de

transferência embrionária é também um fator determinante para os resultados reprodutivos [51].

De uma forma geral, este procedimento inicia-se com a introdução de um espéculo na vagina com o intuito de visualizar o colo do útero, que é então higienizado mediante a utilização de uma solução salina ou de meio de cultura. O muco adicional existente no canal cervical pode ser aspirado por meio de uma seringa esterilizada [51].

Após a confirmação da identidade do paciente, um cateter de transferência é carregado com os embriões e entregue ao médico. O cateter é inserido através do canal cervical e avança até à cavidade uterina onde os embriões são depositados. O cateter é então retirado e devolvido ao embriologista, que o examina com o intuito de detetar se ficou ou não algum embrião retido [51].

Diversos critérios têm demonstrado ter um impacto positivo na ET, tais como o tipo de cateter utilizado, a colocação de embriões a uma determinada distância do fundo uterino, a experiência do operador e a orientação através de ecografia. Por outro lado, o fracasso de uma ET pode estar relacionado com a perturbação do endométrio provocada pelo cateter, a indução de contrações uterinas, a contaminação microbiana, o aumento da mucosa cervical, a deposição dos embriões num local desfavorável, ou até mesmo a danificação dos embriões no decorrer do processo [52].

De facto, a própria técnica utilizada para a ET pode afetar o seu sucesso, nomeadamente o método de carregamento do cateter com meio de cultura e ar. Ainda que não existam argumentos explícitos a favor deste método, um dos seus propósitos é facilitar simultaneamente o carregamento do cateter e o momento da transferência, marcando visivelmente a posição dos embriões no interior do cateter [53].

Adicionalmente, as hipóteses de muco cervical obstruir o cateter e prender os embriões no seu interior, são reduzidas pela presença de bolhas de ar, que permitem delimitar claramente a porção de meio de cultura que contém os embriões. Finalmente, outra vantagem considerável é a possibilidade de rastrear as bolhas de ar no ecógrafo durante a ET, uma vez que estas são representadas por duas linhas distintas [53].

Apesar destes pequenos espaços de ar utilizados para a colocação dos embriões não constituírem um fator fisiológico no útero, o ar carregado no cateter de transferência não tem qualquer efeito negativo nas taxas de gravidez e na implantação [54].

Toda a evolução científica que contribuiu para a otimização dos meios de cultura permitiu que a ET pudesse ser realizada no terceiro dia de desenvolvimento do embrião, quando este se encontra em clivagem, ou no quinto dia, com o embrião em fase de blastocisto. Porém, realizar uma transferência ao quinto dia do desenvolvimento embrionário, parece resultar no aumento das taxas de sucesso de implantação pois

permite uma melhor visualização da qualidade embrionária, diminuindo a necessidade de transferir mais do que um embrião [55].

Como mencionado previamente, apenas um embrião deve ser transferido a fim de evitar gravidezes múltiplas. No entanto, existem exceções e deve-se sempre ter em consideração que este número depende da qualidade embrionária e da idade materna [56]. Os embriões que não forem transferidos a fresco, devem então ser criopreservados para uso posterior.

5. A Criopreservação de Embriões

A criopreservação tem como objetivo "parar o tempo biológico", sendo particularmente útil quando aplicada no contexto da RHA. Esta técnica permite criopreservar embriões de boa qualidade que não chegaram a ser transferidos, de forma a que os mesmos possam ser selecionados e armazenados durante um longo período de tempo sem que se verifique perda significativa do potencial de implantação após a descongelação [40]. Assim, a finalidade óbvia da criopreservação tem sido a de preservar embriões supranumerários, para uso posterior. No entanto, as indicações para a criopreservação de embriões expandiram substancialmente nos últimos anos. Desta forma, também se pode optar por congelar à partida todos os embriões, e efetuar a sua transferência em ciclos subsequentes, sem estimulação ovárica [57].

A criopreservação embrionária total é indicada para todos os pacientes que apresentem elevado risco de síndrome de hiperestimulação ovárica, que tenham resposta ovárica fraca e/ou estimulação prolongada, que demonstrem níveis elevados de progesterona no final da fase de estimulação ovárica e que tenham baixo número de embriões ou outras patologias de fertilidade. Adicionalmente, a criopreservação de embriões está fortemente indicada para a realização de biopsia embrionária para os PGT. Estes incluem o estudo de aneuploidias (PGT-A), as perturbações monogénicas (PGT-M) e os rearranjos estruturais cromossómicos (PGT-SR). Desta forma, os PGT são sempre um motivo para congelar os embriões biopsiados, já que o tempo necessário para reportar o diagnóstico genético excede o limite temporal a que os embriões podem sobreviver em cultura.

Por fim, alguns pacientes podem optar por congelar todos os seus embriões como parte de uma estratégia de preservação da fertilidade, por razões médicas ou sociais [58].

Os embriões podem ser criopreservados em diferentes fases de desenvolvimento: fase de zigoto (dia 1), fase de clivagem (dia 2 ou dia 3), fase de mórula (dia 4) e fase de blastocisto (dia 5, dia 6, e ocasionalmente dia 7). Embora a criopreservação embrionária resulte para todas as fases de desenvolvimento do embrião, a fase mais eficiente de

criopreservação é a fase de blastocisto, apresentando maior probabilidade de implantar em relação às fases de desenvolvimento anteriores. Não obstante, sabe-se que o estágio mais vulnerável do desenvolvimento embrionário são os primeiros 2 a 3 dias, já que os embriões estão mais suscetíveis às condições da cultura [58].

Desde a primeira gravidez viável com embriões criopreservados, têm sido introduzidos protocolos de criopreservação que diferem entre si relativamente ao tipo e à concentração de crioprotetores, ao tempo de equilíbrio, às taxas de arrefecimento e aos dispositivos de criopreservação utilizados.

Estabeleceram-se assim duas abordagens principais para a criopreservação, a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta permite a criopreservação a um ritmo suficientemente lento para possibilitar uma desidratação celular adequada e simultaneamente minimizar a formação de cristais de gelo. Mediante esta abordagem, o conteúdo de água intracelular é convertido em pequenos cristais de gelo intracelular sendo que, para evitar uma cristalização extensa, é necessária uma posterior descongelação rápida [59].

Pelo contrário, a vitrificação é um método de criopreservação que permite a solidificação das células num estado vítreo sem a formação de gelo. O método de vitrificação é o mais utilizado para embriões de mamíferos e requer a utilização de concentrações iniciais elevadas de crioprotetor, de baixos volumes e de taxas de arrefecimento ultrarrápidas [59].

De acordo com vários estudos sistemáticos e de meta-análise, a vitrificação é a melhor estratégia de criopreservação para todas as fases de desenvolvimento do embrião. Esta aumenta significativamente as taxas de sobrevivência dos embriões, traduzindo-se assim, em melhores resultados reprodutivos, quando comparada com a congelação lenta [59].

No decorrer da última década, as técnicas de vitrificação eficientes e seguras, contribuíram para um aumento acentuado dos ciclos de transferência de embriões congelados (TEC), a nível mundial.

Um estudo recente revelou que, em mulheres sem disfunções ovulatórias, a taxa de nascimento vivo não difere de forma significativa entre a transferência embrionária a fresco e a TEC. [60]. Em contrapartida, análises prévias demonstraram que a TEC resulta numa maior taxa de nascimentos vivos do que a transferência de embriões a fresco, entre mulheres com a síndrome do ovário policístico, e que o risco de síndrome de hiperestimulação ovárica é reduzido com a TEC [61, 62] .

Não há atualmente consenso quanto à supremacia de qualquer um dos métodos de transferência, mantendo-se incertezas quanto aos critérios aplicáveis para a seleção do tipo de transferência a adotar.

6. A Eclosão Assistida

A eclosão assistida realizada previamente à ET, surgiu com o intuito de potenciar a implantação do embrião no endométrio, evitando o gasto de energia que é requerido para uma eclosão espontânea. Apesar de todos os procedimentos de eclosão assistida consistirem na manipulação da Zona Pelúcida (ZP), as várias técnicas são altamente diversificadas, apresentando entre elas, resultados distintos no que diz respeito à capacidade de eclosão dos embriões.

6.1. Função e Fisiologia da Zona Pelúcida (ZP)

A zona pelúcida (ZP) é uma estrutura dinâmica altamente organizada e que é essencial para a oogénese, para a fertilização e para o desenvolvimento embrionário [63].

A ZP é uma matriz extracelular glicoproteica que é sintetizada e secretada através dos oócitos durante o desenvolvimento folicular. Conforme o crescimento dos oócitos no ovário, inicia-se a formação da ZP, primeiro com aspeto fibroso e difuso ao longo da superfície dos oócitos em crescimento, e posteriormente, com transformação para uma ZP uniforme, que continua a engrossar à medida que os oócitos crescem (Figura 3) [64].

Tendo em consideração que a ZP é constituída por uma matriz extracelular viscosa e elástica, é provável que esta estrutura esteja relacionada com o contacto que é estabelecido entre os oócitos em crescimento e as células da *coroa radiata*. Esta viscosidade é importante pois permite a estabilidade desta interação, que é essencial para o correto crescimento dos oócitos e para o desenvolvimento folicular, sem o qual a fertilidade feminina não é possível [65].

A ZP é crucial para a indução da reação acrossómica, enquanto medeia o reconhecimento inicial espermatozoide-ovócito, um passo que é essencial na fertilização, após o qual sofre modificações bioquímicas, que causam o seu endurecimento de forma a impedir a polispermia. Desta forma, os espermatozoides livres são incapazes de se ligar à ZP de óvulos já fertilizados ou de embriões em fase de clivagem [4]. Além disso, *in vivo*, a ZP protege o embrião aquando da sua passagem do oviduto para o útero. *In vitro*, a ZP tem ação protetora sobre os embriões que se encontram sobre stress mecânico e químico [66].

Estudos têm vindo a comprovar que uma possível causa da infertilidade feminina são as mutações pontuais que se verificam em genes da ZP, o que reforça que a presença da ZP em torno de oócitos é um fator essencial para a fertilidade nas mulheres [67].

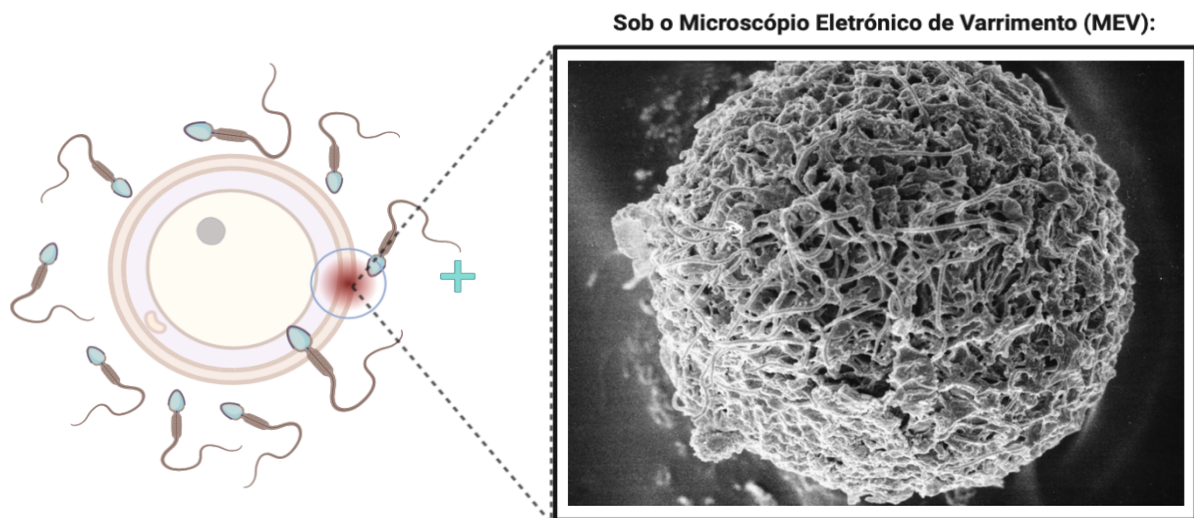


Figura 3. Superfície externa da ZP de um oócito maduro durante a fertilização. De realçar o aspeto fibroso da matriz distribuído de forma uniforme pela totalidade do oócito. MEV, 1200X. Adaptado de [4]. Desenvolvido com recurso a BioRender.com.

6.2. A Eclosão *in vivo*

Ao atingir a fase de blastocisto, a expansão física da massa embrionária reduz a espessura da ZP em preparação para a eclosão. Desta forma, ocorre a rutura focal da ZP e a extrusão do embrião através da zona fraturada, de modo a que as células da TE interajam com as células do endométrio e a implantação seja possível [68].

O processo de eclosão é um acontecimento importante que requer que os blastocistos se libertem e atravessem a ZP para que ocorra implantação. No decorrer do processo, o blastocisto expandido passa por ciclos sucessivos de contração e expansão [69].

Pensa-se que a eclosão possa ser mediada por uma ação mecânica resultante do aumento da pressão no interior do blastocélio, devido à ação de uma protease de origem embrionária ou devido a uma lisina de origem uterina [70].

Não obstante, a expansão mecânica, a elasticidade do blastocisto e o desgaste da ZP são fatores essenciais para o processo de eclosão que podem ser influenciados negativamente pela própria aplicação das tecnologias de RHA. Tanto o envelhecimento feminino como a cultura *in vitro* extensivas estão associadas ao endurecimento e ao engrossamento da ZP [71].

Existe controvérsia na literatura sobre a relação entre a espessura da ZP e a sua dureza. Na realidade, quantificar a densidade da ZP é difícil tanto devido à necessidade de fixar o oócito/embrião como de utilizar ácidos para o dissolver. Em ambos os casos, o

oócito/embrião é danificado. Porém, a constatação geral é que há fraca relação entre a espessura da ZP e o seu endurecimento, normalmente medido através da densidade [72].

Estudos anteriores verificaram que a espessura da zona diminui no decurso da cultura *in vitro*, havendo uma correlação significativa entre a espessura da zona e o número de blastómeros. De facto, os embriões com um maior número de blastómeros apresentam maior potencial para libertar os fatores líticos necessários para o desbaste da zona.

A ZP também mostrou ser significativamente menos espessa nas mulheres com idade mais avançada [73].

Por outro lado, enquanto a espessura da ZP decresce devido ao cultivo prolongado dos embriões, a densidade da ZP aumenta. Simultaneamente, também no caso dos embriões das mulheres com mais idade, verifica-se um aumento da densidade da ZP em relação às mulheres mais jovens [72].

Os dados atuais indicam ainda, que apesar da vitrificação ser atualmente a técnica mais eficiente para preservar embriões humanos, esta também tem consequências para os mesmos, sendo o endurecimento da ZP uma delas [74, 75].

6.3. O Surgimento da Eclosão Assistida em RHA

Geralmente, somente uma reduzida proporção dos blastocistos humanos sofrem eclosão espontânea *in vitro* antes da transferência intrauterina e mesmo quando a eclosão se procede de forma natural, há sempre um gasto energético associado.

De notar, que o principal e culminante objetivo da eclosão assistida é facilitar ao máximo a implantação do embrião, de forma a melhorar os resultados reprodutivos [76]. Por conseguinte, a eclosão assistida deve ser realizada imediatamente antes da ET, no próprio dia, a fim de que só ocorra uma eclosão integral do embrião após a sua transferência para o endométrio. Este aspeto é crucial, uma vez que uma eclosão total do embrião, durante o período de cultura, é indesejável e torna o embrião mais vulnerável à manipulação *in vitro*.

Uma observação importante que levou à introdução clínica da eclosão assistida foi a descoberta de que embriões com orifícios artificiais na ZP, aparentemente tinham taxas de implantação elevadas. Adicionalmente, verificou-se e que os embriões com melhor prognóstico para a implantação eram os que apresentavam uma redução na espessura da ZP. [77, 78].

Contudo, o fator limitante para o sucesso da eclosão não aparenta ser a espessura, mas antes a resistência da camada interna da ZP resultante das condições de cultura

prolongada ou da criopreservação. A realização de uma eclosão assistida veio, desta forma, solucionar este problema [79, 80].

Ademais, a finalidade do procedimento de eclosão assistida pode também estar relacionada com a tentativa de ultrapassar a carência na produção de uma lisina embrionária *in vitro*, que é responsável por promover a eclosão após a expansão do blastocisto [81].

Não obstante, há evidências de que embriões que foram manipulados e nos quais se aplicou eclosão assistida, tendem a implantar um dia mais cedo do que os embriões não eclodidos, pelo que se pode inferir que a eclosão assistida facilita a implantação ao permitir o contacto dos embriões com o endométrio mais cedo [82].

Por fim, sabe-se que a maioria dos embriões eclodem durante uma “janela de implantação”. Este é um período de tempo crítico em que o endométrio atinge o seu estado ideal de receptividade para a implantação, o que sugere a importância de um sincronismo preciso entre o embrião e o endométrio [83]. Este fator é relevante uma vez que, os embriões em cultura eclodem e implantam a um ritmo inferior ao verificado naturalmente e a possível combinação de uma eclosão tardia do embrião com um desenvolvimento endometrial avançado, pode apresentar um ambiente desfavorável para a implantação [84].

Em suma, o insucesso na rutura da ZP e a subsequente eclosão defeituosa por qualquer um dos fatores acima mencionados, têm sido sugeridos para justificar, pelo menos em parte, as taxas de implantação relativamente baixas na sequência da aplicação de técnicas de reprodução assistida [85]. Assim, com vista a facilitar a eclosão dos embriões, diferentes tipos de eclosão assistida foram desenvolvidos [86] sendo que a manipulação da ZP pode incluir: orifícios, fendas ou o desbaste com diferentes dimensões através da ação mecânica, química ou com auxílio de um raio laser.

6.4. As Diferentes Técnicas de Eclosão assistida

Têm sido utilizados métodos mecânicos, químicos e, mais recentemente, a eclosão induzida por laser, de forma a obter orifícios na ZP ou para a estreitar superficialmente. Estes três tipos de eclosão assistida têm como objetivo melhorar as taxas de gravidez [87].

De facto, o desenvolvimento de um equipamento com sistema de laser infravermelho tornou-se um marco no domínio da eclosão assistida. Quer devido à sua relativa facilidade de utilização, quer por permitir uma maior uniformidade entre os profissionais

da área em relação a outras metodologias, este tornou-se um procedimento padronizado de alta precisão [88].

Independentemente da técnica utilizada, é também importante distinguir se a zona pelúcia permanece intacta como no processo de redução da sua espessura (quimicamente ou por laser), se foi totalmente rompida (quando um buraco é feito quimicamente, com laser ou mecanicamente), ou se foi completamente removida (quimicamente) [89].

6.4.1. As Técnicas Mecânicas de Eclosão assistida

A técnica de eclosão assistida, foi descrita pela primeira vez por Cohen *et al.* em 1988 utilizando o procedimento de dissecação parcial da ZP de embriões [90].

Neste procedimento mecânico, o embrião é estabilizado por uma pipeta de fixação, enquanto a ZP é perfurada com o auxílio de uma micropipeta que é colocada tangencialmente no espaço entre a ZP e os blastómeros até atravessar e perfurar novamente a ZP. Uma estreita porção da zona pelúcia é posteriormente friccionada contra a pipeta de fixação abrindo assim, uma zona entre os dois lados perfurados pelo micropipeta (Figura 4) [86].

Este mecanismo é rápido de executar, porém permite a obtenção de orifícios de tamanhos variáveis e que nem sempre são os mais adequados [90, 91].

De facto, o receio de que um orifício na ZP pudesse privar o embrião da sua camada protetora foi o que fez surgir o estreitamento da ZP como um método alternativo, que se baseia na redução da espessura da ZP sem necessidade de esta ser perfurada [92].

Desta forma, o estreitamento mecânico, também foi descrito como uma forma de eclosão assistida, por Nijs *et al* [93]. Neste procedimento, a espessura da matriz da ZP é então diminuída, através de fricção com uma micropipeta. Não é feita nenhuma lacuna na ZP, pelo que o risco de perda de blastómeros e de invasão por microrganismos é reduzido.

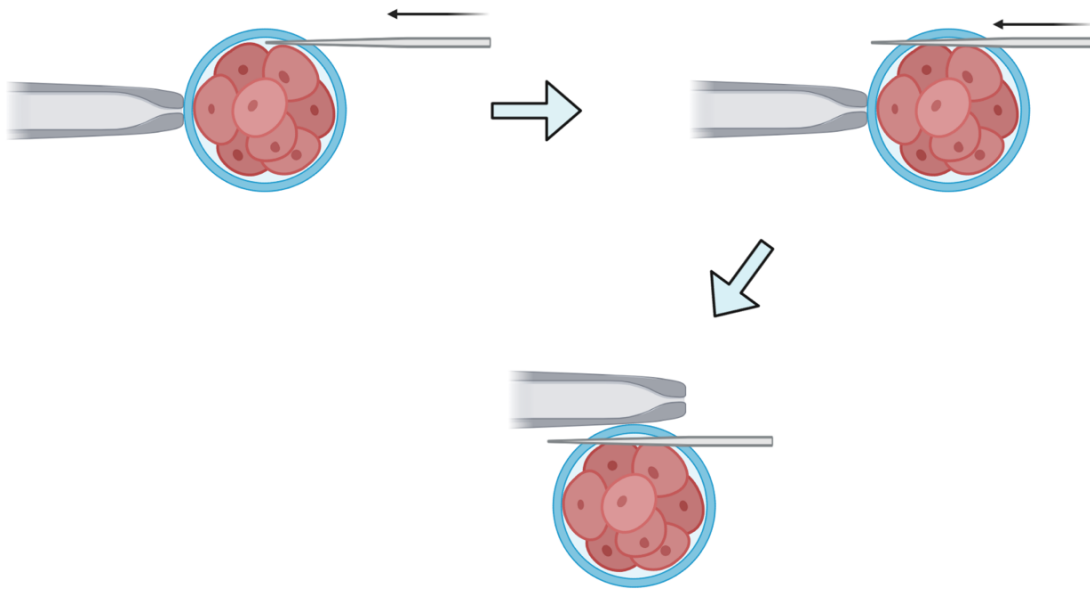


Figura 4. Representação sequencial da Dissecação Parcial da ZP. A pipeta de fixação (esquerda) retém o embrião, e uma micropipeta (direita) é deslocada através da ZP. A micropipeta, ainda conectada ao embrião, é colocada em baixo da pipeta de fixação, forçando uma abertura na ZP. Adaptado de [3]. Desenvolvido com recurso a BioRender.com

6.4.2. As Técnicas Químicas de Eclosão assistida

Quanto às técnicas químicas, a eclosão assistida utilizando a solução de *Tyrode* foi também descrita em pormenor por Cohen *et al* [94]. Nesta técnica, o embrião é fixado com auxílio de uma pipeta de fixação e uma micropipeta é previamente colocada em ácido a cada micromanipulação. A solução ácida é expelida suavemente sobre uma pequena área até que a zona seja rompida. É exercida aspiração imediatamente após a rotura da ZP, para evitar que o excesso de ácido penetre no espaço perivitelino (Figura 5). Esta técnica requer uma manipulação extremamente rápida para evitar a exposição desnecessária do embrião à solução ácida uma vez que esta pode ser prejudicial para os blastómeros adjacentes à parte da ZP que foi perfurada. A lavagem contínua do embrião é assim indispensável, pois a solução ácida de *Tyrode* é embriotóxica e pode alterar a viabilidade dos embriões [94].

A redução da espessura da ZP com a solução de *Tyrode* também foi descrita em humanos e envolve a aplicação do ácido para efetuar uma diminuição da área de espessura de cerca de um terço da periferia da ZP, sem criar uma abertura [95].

Tanto os métodos mecânicos como os químicos requerem uma grande capacidade técnica para produzir orifícios uniformes, bem definidos e padronizados, utilizando micropipetas montadas em micromanipuladores. É importante minimizar o tempo que o

embrião permanece fora da incubadora e aperfeiçoar as metodologias para reduzir as oscilações do pH e as variações de temperatura, sendo estas potencialmente prejudiciais ao desenvolvimento embrionário [85].

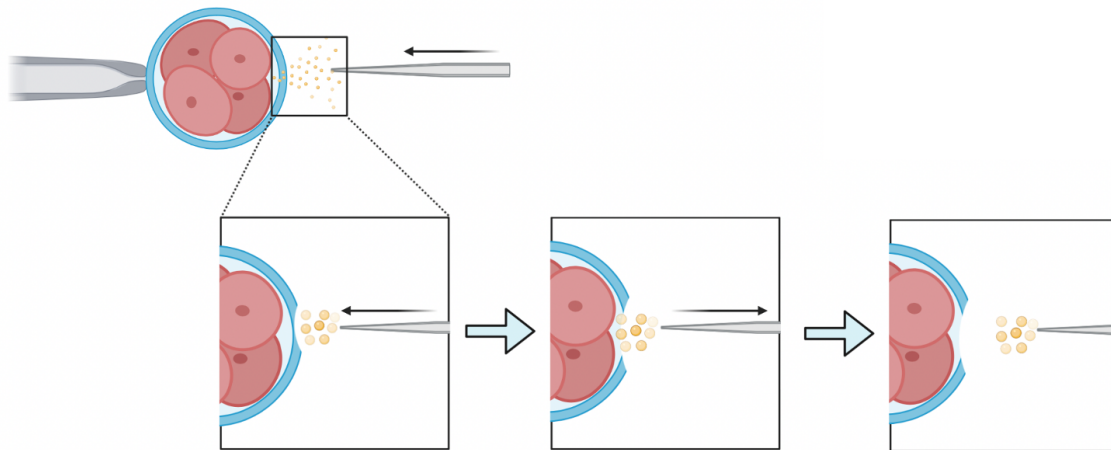


Figura 5. Eclosão Assistida por etapas, utilizando solução ácida de Tyrode. As setas pretas indicam o movimento do fluxo e substância a amarelo representa o ácido. Os fragmentos são ocasionalmente removidos. Adaptado de [3]. Desenvolvido com recurso a BioRender.com

6.4.3. Aparecimento do Laser na técnica de Eclosão Assistida

A eclosão assistida da ZP com auxílio de um laser foi introduzida em 1991 por Tadir *et al* [96], sendo que, entretanto, vários tipos de laser foram estudados [97, 98]. O uso de laser apresenta uma ferramenta excelente para procedimentos microcirúrgicos, uma vez que a fonte de energia é facilmente direcionada para a área pretendida. Assim, é produzido um orifício controlado e preciso, que é consistente entre os profissionais da área [85].

Foram propostas duas abordagens de aplicação do sistema de laser. Uma delas é o modo "contacto", em que o raio de laser é dirigido através de uma fibra ótica que acaba por tocar no embrião. A necessidade de assistência através de uma pipeta de vidro e de fibra ótica representa um grande inconveniente devido à necessidade de fabrico e esterilização das pipetas [99].

O método alternativo e de preferência geral, consiste no fornecimento de um laser através de um método "sem contacto". Também para este método, têm sido propostos lasers com diferentes comprimentos de onda, contudo, a radiação infravermelha é a mais apropriada, especialmente quando se têm em consideração os riscos mutagénicos [82].

A abertura da zona é realizada expondo a ZP ao laser, sendo que, o tamanho do furo pode ser determinado mediante a variação do tempo de irradiação. Inicialmente, o laser foi utilizado para criar um único orifício na ZP. No entanto, posteriormente, Blake et al. demonstrou um incremento significativo de eclosão *in vitro* utilizando o laser para afinar esta zona sem criar um orifício [87].

Assim, atualmente são comumente utilizados três métodos diferentes dentro da técnica de eclosão com laser, com diferentes graus de invasão. O laser tanto pode ser utilizado para criar um buraco que penetre completamente toda a camada da ZP, como pode ser usado para criar um pequeno buraco em apenas parte da espessura da ZP, traduzindo-se numa eclosão parcial do embrião. Por último, o laser pode ser utilizado para afinar uma grande área, interna ou externa, da ZP em torno do embrião, normalmente um quarto da mesma (Figura 6).

Os efeitos concretos destas diferentes técnicas continuam ainda a ser objeto de controvérsia e como tal, o método ótimo de eclosão assistida ainda está em debate [6]. Os lasers modernos que se encontram nas clínicas de RHA são fabricados de forma a que o feixe percorra através de uma objetiva de um microscópio invertido, com contraste de fase e ótica de modulação Hoffman. Entre eles, há quatro tipos utilizados em contexto clínico, dos quais os comprimentos de onda são 1480nm ou 1460nm e a potência é de 300 ou 400mW [6].

A tecnologia de Piezo foi mais tarde introduzida, como mais um método que também permite a perfuração da ZP. Enquanto uma pipeta de fixação retém o embrião, movimentos vibratórios produzidos por um pulso elétrico, são utilizados para esculpir uma área cônica limitada na ZP. Cinco a oito aplicações em áreas adjacentes podem ser utilizadas para produzir um grande orifício, o que favorece a eclosão integral do blastocisto [100].

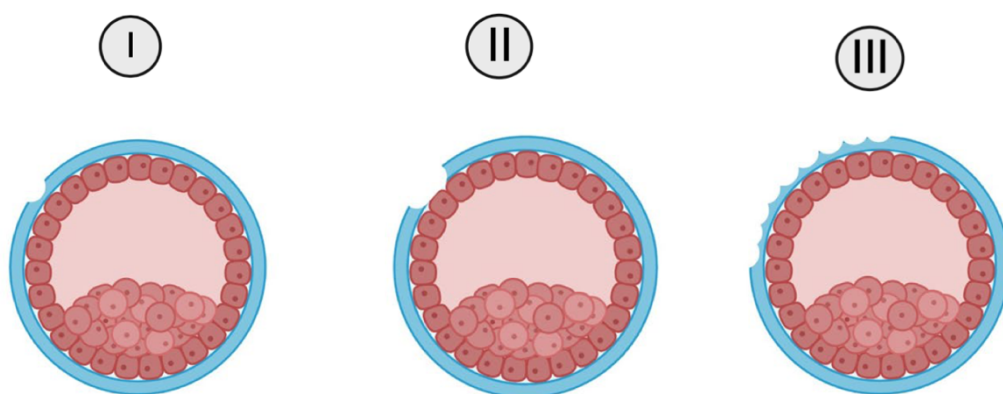


Figura 6. Os três métodos mais utilizados para a eclosão assistida por meio de laser. (I) Eclosão assistida parcial, no qual é gerado um único furo, sem atingir a membrana interna; **(II)** Eclosão assistida completa, no qual um único furo é perfurado completamente através da ZP; **(III)** Um quarto de eclosão assistida, no qual cerca de um quarto do perímetro da ZP é parcialmente perfurada. Adaptado de [6]. Desenvolvido com recurso a BioRender.com

6.4.4. A Incerteza na Aplicação da Técnica Atual de Eclosão Assistida

É incerto se a eclosão assistida melhora efetivamente as taxas de sucesso reprodutivas, ou se está, pelo contrário, associada a quaisquer implicações adversas. Segundo estudos anteriores, a eclosão assistida traduziu-se num aumento significativo da taxa de gravidez clínica comparativamente à ausência de eclosão. No entanto, a maior parte dos resultados experimentais continuam a não registar um aumento estatisticamente significativo no que diz respeito à taxa de nascimentos vivos [76].

Nomeadamente, existem estudos prospetivos e aleatórios que evidenciam claramente que não há qualquer benefício na utilização da técnica de eclosão assistida quando aplicada a um grupo indiferenciado de pacientes [101-103].

É importante ter em consideração que existem variações nas técnicas de eclosão utilizadas, nos pacientes que são selecionados e na própria conceção dos estudos, o que dificulta a comparação de dados provenientes de diferentes grupos de investigação [85].

Um estudo recente demonstrou que o padrão de eclosão assistida dos embriões utilizando a técnica de abertura da ZP e a técnica de redução de espessura da mesma, é bastante diferente. Desta forma, foi salientado a importância de não conjugar os resultados obtidos com metodologias distintas, quando se tiram ilações a partir de revisões sistemáticas das técnicas de eclosão assistida no contexto da RHA (Figura 7) [5].

Não obstante, vários estudos têm vindo a associar a utilização de procedimentos de eclosão assistida a um risco acrescido de gravidezes múltiplas [104].

Ainda que inicialmente, a eclosão assistida tenha sido ministrada como sendo universalmente benéfica, este não parece ser o caso, pelo que é fundamental definir claramente quem pode beneficiar do uso desta técnica [86, 101, 105]. Por conseguinte, a eclosão assistida pode ter utilidade no incremento das taxas de implantação embrionária em humanos, desde que seja apenas aplicada em casos devidamente selecionados. Desde então, têm sido propostos vários fatores para identificar os grupos de pacientes que podem beneficiar desta técnica [85]. Estes fatores incluem o número de ciclos de FIV falhados até à data, a idade da paciente, a TEC e a espessura da ZP. Por conseguinte, as indicações frequentemente preconizadas para eclosão assistida são a idade materna avançada, a falha recorrente de implantação ou a utilização de embriões previamente criopreservados [70].

Ademais, de acordo com os resultados de um estudo recente, o maior indicativo para a realização de eclosão assistida é a sua utilização antes da biopsia embrionária, constituindo cerca de 90% dos casos [106].

Atualmente não existe um protocolo único para realização da técnica de eclosão assistida, sendo esta uma área repleta de dados contraditórios, o que pode explicar parcialmente a inconsistência na eficácia das técnicas de eclosão assistida mesmo para um grupo específico de doentes. Por exemplo, uma análise de ensaios clínicos realizados por *Wellington* concluiu que a eclosão assistida só permitia melhorar a taxa de gravidez clínica e a taxa de natalidade em mulheres que sofreram falhas de implantação repetidas, e não em mulheres de idade avançada. Mais ainda, um estudo também sugeriu que o insucesso repetido de implantações por si só já não é um indicador para o uso desta técnica, sendo que a eclosão assistida pode até dificultar a implantação em pacientes mais jovens [107, 108].

No entanto, até se munirem de evidências devidamente fundamentadas, as clínicas devem continuar a aplicar a técnica de eclosão assistida, a fim de procurar satisfazer as necessidades de pacientes que apresentem um fraco prognóstico de fertilidade e que petitionem recorrer a esta técnica complementar [106].

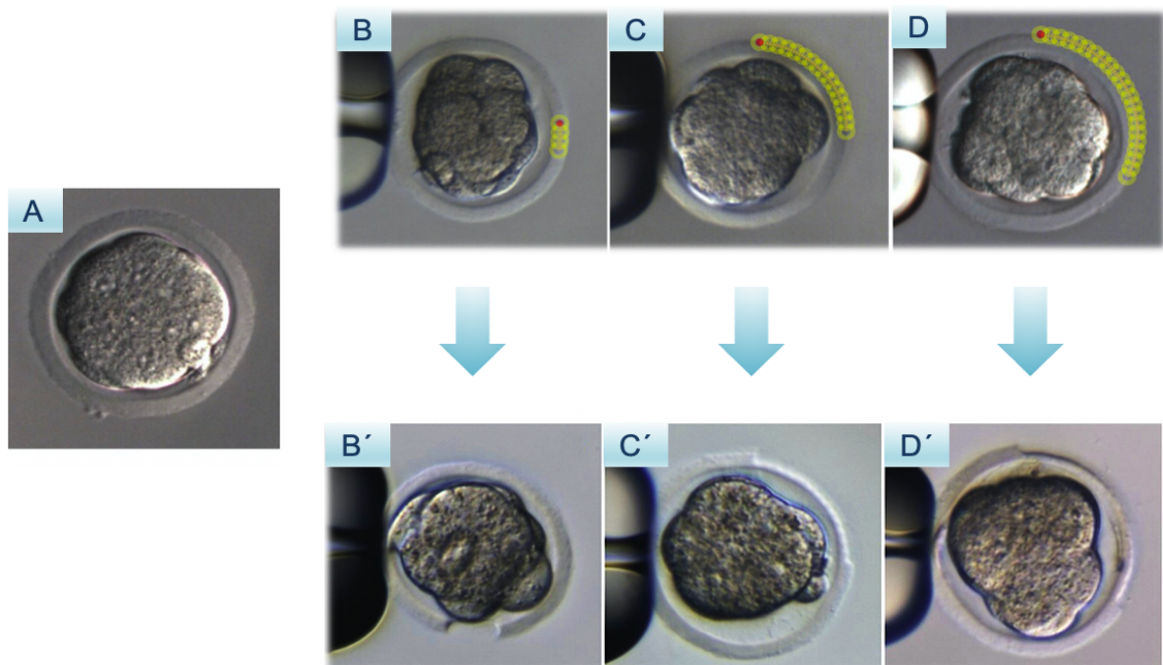


Figura 7. Embriões manipulados de acordo com 4 grupos experimentais. (A) Grupo de controlo (no grupo de controlo os embriões não foram manipulados e a ZP permaneceu intacta). (B a B') Grupo experimental com abertura da ZP (a largura da abertura para cada embrião foi de 25 mm). (C a C') Grupo ZT25 (25% de perímetro foi desbastado). (D a D') Grupo ZT35 (35% de redução na espessura da ZP). Adaptado de [5].

6.5. Eclosão assistida em Embriões Colapsados

A monitorização contínua com a tecnologia *time-lapse*, proporcionou aos embriologistas a identificação de características ainda desconhecidas do desenvolvimento embrionário, nomeadamente a deteção de episódios de colapso em blastocistos [109].

Os episódios de colapso são comuns em embriões humanos, contudo, o seu mecanismo e a forma como este evento afeta o desenvolvimento embrionário ainda não está totalmente elucidado. Especula-se que a variação da força mecânica e a alteração da pressão durante o evento de colapso possam danificar as *gap junctions* entre as células da TE, originando uma TE defeituosa [110].

Além disso, estudos realizados demonstraram que o colapso está associado a uma bomba $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$, o que implica um gasto adicional de energia, sugerindo que colapsos bruscos e repetidos em blastocistos humanos podem conduzir a um défice energético [111].

A investigação retrospectiva, relata que blastocistos que sofrem eventos de colapso durante o seu desenvolvimento têm um impacto negativo na implantação e apresentam probabilidade reduzida de conduzir a uma gravidez clínica, em comparação com os embriões em que não é relatado qualquer episódio de colapso [112, 113]. Por outro lado, alguns estudos mostram que os colapsos fracos podem ajudar o subsequente processo de eclosão de embriões, uma vez que ajudam a quebrar a ZP [114].

A relação entre colapsos e parâmetros morfocinéticos também tem sido estudada. Os embriões colapsados evidenciam um menor tempo de divisão celular, uma redução na sincronia entre os blastómeros e ciclos celulares mais breves. Isto indicia que os embriões que sofreram um colapso acentuado apresentem pior qualidade e, por conseguinte, um desenvolvimento embrionário mais fraco [114]. Desta forma, o evento de colapso de blastocistos pode ser um parâmetro adicional a ter em consideração na seleção embrionária, especialmente nos casos em que vários blastocistos estão disponíveis para a ET.

Apesar de existirem escassas evidências da contribuição da eclosão assistida para o sucesso na implantação [115], estudos têm vindo a apontar o benefício da realização de eclosão assistida em embriões colapsados de forma a restaurar o potencial de implantação comprometido pelo colapso destes embriões [116].

O motivo subjacente à realização de eclosão assistida em embriões colapsados reside nas constantes e fortes contrações infligidas no blastocisto durante o desenvolvimento embrionário. Assim, existe um desperdício adicional de energia imprescindível para atingir uma eclosão orgânica e, por conseguinte, para o processo de implantação.

Capítulo II – Componente de Investigação

Impacto da Eclosão Assistida de Embriões Humanos nos Resultados Reprodutivos

1. Objetivos

O sucesso contínuo da RHA reside na dedicação e habilidade dos embriologistas, mas também no desenvolvimento e progresso contínuo das tecnologias laboratoriais. Este aspeto é imperativo para proporcionar aos pacientes o melhor serviço e uma maior probabilidade de gravidez.

A eclosão assistida é frequentemente utilizada no contexto da RHA, e as suas diferentes técnicas estão bem estabelecidas. No entanto, como mencionado anteriormente, a influência que estas técnicas têm nos resultados reprodutivos continua a ser alvo de atenção e debate dentro da comunidade científica. Apesar da aplicação de eclosão assistida em embriões, via laser, não ser recomendada por rotina para todos os pacientes, a sua aplicação pode ser benéfica para certas subpopulações. A eclosão assistida pode ser realizada em embriões frescos ou criopreservados através de diferentes métodos. No entanto, este trabalho tem como intuito a recolha de dados específicos relativos a TEC, utilizando apenas o método de eclosão assistida via laser, para abertura ou desbaste da ZP.

O primeiro objetivo deste trabalho é comparar diferentes parâmetros laboratoriais e os resultados reprodutivos de casos em que se realizou eclosão assistida, com aqueles em que não se procedeu ao uso desta técnica. Tendo em consideração estudos recentes que apontam para o benefício da eclosão assistida em embriões colapsados, serão também recolhidos dados referentes a este evento.

O segundo objetivo deste trabalho pretende aferir sobre o impacto do colapso embrionário nos resultados reprodutivos. Assim, posteriormente, será feita uma comparação entre os resultados reprodutivos dos casos em que os blastocistos colapsaram durante o seu desenvolvimento, antes da transferência, com os casos em que embriões não colapsados foram transferidos.

O principal propósito deste trabalho é proporcionar à comunidade científica a aquisição de novos conhecimentos que poderão ser essenciais para o aprimorar da técnica de eclosão assistida. Pretende-se obter uma maior clareza sobre quais os casos clínicos em que a técnica deve ser utilizada de forma a contribuir para uma melhoria das taxas de sucesso reprodutivas no contexto da RHA.

2. Materiais e Métodos

2.1. Dimensão do estudo e elegibilidade dos intervenientes

Este estudo pretende cumprir com dois objetivos, sendo que para ambos foi necessário realizar uma análise retrospectiva associada a diferentes ciclos RHA, com o auxílio do software informático da clínica privada Ginemed.

De forma a concretizar o primeiro objetivo, ou seja, comparar os resultados reprodutivos de embriões onde se efetuou eclosão assistida com aqueles que foram transferidos sem utilizar a técnica, foram recolhidos dados de pacientes que realizaram ET durante o ano de 2020, em todas as sedes Ginemed (Sevilha, Madrid, Valencia, Bilbao, Zaragoza, Murcia, Huelva, Cádiz e Lisboa).

Assim, a primeira população amostral consiste em pacientes com óvulos próprios que foram submetidos a ICSI ou FIV e cujos embriões foram congelados para posterior seleção e transferência.

A análise inclui 354 ciclos de mulheres submetidas à sua primeira TEC, o que se traduz num total de 354 embriões transferidos, uma vez que foram apenas selecionados para esta porção do estudo, os ciclos correspondentes à transferência de um único embrião (SET). Desta forma, os dados incluem apenas ciclos diferidos e as transferências abordadas nesta análise foram compreendidas entre janeiro e dezembro de 2020. A idade das pacientes variou entre os 19 e os 45 anos e, o desenvolvimento embrionário oscilou entre o 5º e 6º dia, no momento da transferência.

Para esta população, a informação retirada do software relativamente à eclosão assistida consistiu meramente em dados referentes à sua aplicação, ou seja, se a técnica foi ou não realizada.

De forma a satisfazer o segundo objetivo deste trabalho, que incide na comparação dos resultados reprodutivos da transferência de embriões que colapsaram, com os resultados reprodutivos de embriões não colapsados, os dados foram também retirados do software da clínica. No entanto, para avaliar os eventos de colapso embrionário foi ainda necessário complementar a análise com o auxílio do software do equipamento de *time-lapse* Geri+.

Esta segunda parte do estudo, incidiu sobre pacientes que realizaram fecundação *in vitro* no decorrer do ano de 2021 apenas na sede Ginemed Lisboa.

A população estudada compreende um total de 51 mulheres cujas idades variaram entre os 28 e os 44 anos e as punções desta análise foram efetuadas entre janeiro e novembro de 2021. Assim, a análise conta com 51 transferências e um total de 78 embriões

transferidos sendo que se incluíram transferências de apenas 1 (SET) ou de 2 embriões (DET).

A informação recolhida sobre a eclosão assistida foi mais detalhada que na população anterior, tendo-se obtido dados relativos ao tipo de técnica de eclosão assistida realizada nos embriões.

No que respeita às causas da infertilidade que estão subjacentes aos casais inseridos nesta análise, as causas são as mais diversas e serão enumeradas desde as mais frequentes até às menos comuns: causa idiopática, oligozoospermia, casais mono/homoparentais, endometriose, astenozoospermia, azoospermia, obstrução das trompas, adenomiose, miomas uterinos, anovulação, teratozoospermia, fator ovocitário, oligoteratoastenospermia, casal sorodiscordante e idade.

A origem das amostras de esperma também constitui parte da informação recolhida e variou entre as colheitas a fresco e as amostras congeladas presentes no banco de esperma. Adicionalmente, foi também recolhida informação sobre a existência ou não de um fator de infertilidade masculina severa.

2.2. Avaliação da Qualidade Embrionária

De forma a concretizar ambos os objetivos deste trabalho, foi essencial recolher informação respetiva à qualidade embrionária, visto que este é um dos fatores que mais se reflete nos resultados reprodutivos. Para tal, foi necessário obter estes dados através do software da clínica, onde a informação sobre a qualidade embrionária se encontrava de acordo com os Critérios de Classificação de ASEBIR (*Asociación para el Estudio de La Biología de la Reproducción*) [117]. Porém, para este estudo foi apelativo utilizar um outro sistema de classificação, tendo sido necessário fazer uma reavaliação da qualidade embrionária segundo o consenso de Istambul (Tabela 1) [1]. Este sistema de classificação tem a vantagem de resultar de um consenso internacional no que respeita à avaliação morfológica de oócitos e embriões e, como tal, esta padronização proporciona comparações mais eficazes dos resultados reprodutivos.

Segundo este sistema, os embriões em fase de blastocisto, são avaliados em função do seu grau de expansão, da qualidade da MCI e da qualidade da TE.

A MCI é classificada como: 1, quando é saliente, facilmente perceptível, com numerosas células compactadas e firmemente aglomeradas (Figura 8B); 2, quando é facilmente discernível, contendo muitas células, mas que se encontram dispersamente agrupadas (Figura 8A); 3, quando é difícil de identificar, com poucas células. Já a TE é classificada como: 1, quando tem um elevado número de células a formar um epitélio coeso; 2,

quando tem menos células originando um epitélio menos consistente; 3, quando apresenta um reduzido número de células. Os embriões podem assim ser classificados por um sistema numérico de 1 a 4, relativamente ao seu grau de expansão. Neste caso, 1 corresponde a um blastocisto precoce, 2 é um blastocisto (Figura 8A), 3 representa um blastocisto expandido (Figura 8B) e 4 é um blastocisto a eclodir ou totalmente eclodido (Figura 8C).

O embrião ideal nesta fase de desenvolvimento é um embrião totalmente expandido com uma MCI proeminente, facilmente discernível e constituída por muitas células compactadas e firmemente aderidas umas às outras. Deve ainda apresentar uma TE que integre numerosas células constituindo um epitélio coeso. (Figura 8B).

	Valor	Classificação
Grau de Expansão	1	Precoce
	2	Blastocisto
	3	Blastocisto expandido
	4	Blastocisto eclodido/em eclosão
ICM	1	Boa
	2	Razoável
	3	Fraca
TE	1	Boa
	2	Razoável
	3	Fraca

Tabela 1. Sistema de classificação segundo o consenso de Istambul para blastocistos. Este sistema resulta na combinação do grau de expansão (1-4), da qualidade da MCI (1-3) e da qualidade da TE (1-3). Adaptado de [1].



Figura 8. Embriões em fase de blastocisto. (A) Blastocisto com qualidade 221; (B) Blastocisto com qualidade 311; (C) Blastocisto a eclodir, libertando-se da ZP. Imagens propriedade da clínica Ginemed, Lisboa.

2.3. Identificação de um Evento de Colapso

Para avaliar o colapso embrionário, foi necessário recorrer ao software do equipamento de *time-lapse* Geri+. Para o efeito, foi feita uma avaliação minuciosa e cuidada, para cada paciente, de quantos dos embriões obtidos conseguiram atingir a fase de desenvolvimento de blastocisto. Adicionalmente, averiguou-se quantos desses blastocistos colapsaram antes da sua vitrificação. De facto, foi possível identificar dois tipos de contrações nos blastocistos, umas mais fracas em que as células da TE estão separadas a menos de 50% da ZP, e uma contração acentuada em que esta separação é claramente superior a 50%.

Nesta análise, o episódio de colapso foi considerado apenas quando se observou uma separação de pelo menos 50% da superfície das células da TE da ZP (Figura 9C). A escolha desta percentagem é baseada num estudo recente que refere este valor limite como o mais adequado, pois permite uma identificação clara do colapso tornando pouco provável uma avaliação subjetiva [109]. Assim, qualquer contração com redução de volume inferior a 50% não foi considerada como evento de colapso nesta análise (Figura 9B).

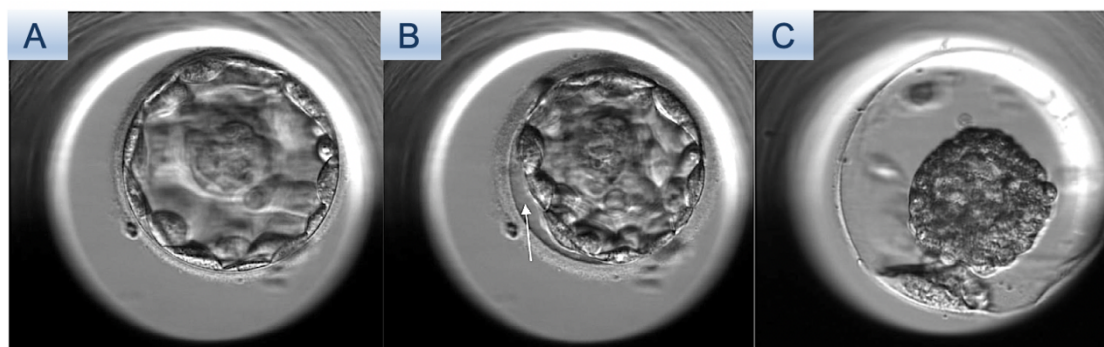


Figura 9. Exemplos de blastocistos com diferentes graus de contração (A) Blastocisto sem qualquer tipo de contração; (B) Blastocisto com fraca contração. A seta indica o local que sofreu contração (redução de volume inferior a 50%); (C) Blastocisto humano em cultura com uma redução de volume superior a 50%, considerado como um episódio de colapso embrionário. Imagens propriedade da clínica Ginemed, Lisboa

2.4. Recolha e Seleção dos dados retrospectivos

Numa primeira instância, todos os dados clínicos relevantes para a análise contidos no software, foram importados para dois ficheiros EXCEL distintos. Primeiramente, foi realizada uma importação para um ficheiro EXCEL de toda a informação relativa aos ciclos diferidos e às respetivas transferências realizadas entre janeiro e dezembro de 2020. Desta forma, pretendeu-se fazer o estudo da influência da eclosão assistida nos resultados reprodutivos. Posteriormente, foi gerado o segundo ficheiro, com um número de ciclos significativamente menor, que dizia respeito às transferências realizadas ao longo de 2021. O objetivo foi inferir qual o impacto que a transferência de embriões colapsados teve nos resultados reprodutivos.

Toda esta informação em bruto teve de ser processada e estruturada. Em primeiro lugar, foram eliminados os ciclos que careciam totalmente ou parcialmente dos dados relevantes para a análise, em ambos ficheiros. Os critérios de elegibilidade da informação a recolher e a consequente eliminação dos dados não significativos para a análise foi essencial, pois permitiu um estudo mais homogéneo e coerente.

Para a primeira análise, todos os ciclos de doação de ovócitos, de transferência de embriões a fresco e de DET, foram suprimidos à partida. No segundo ficheiro, foram imediatamente eliminados todos os ciclos relativos a transferências a fresco e todos os ciclos em que os embriões foram submetidos a PGT.

Como referido anteriormente, na primeira análise, a principal variável de estudo a correlacionar com os resultados reprodutivos foi a aplicação de eclosão assistida em blastocistos. As restantes variáveis selecionadas para o estudo foram a idade materna no momento da transferência, o dia de desenvolvimento em que o embrião foi transferido e a qualidade embrionária.

Na segunda análise, a existência de eventos de colapso aquando do desenvolvimento embrionário foi a principal variável para averiguar se existiam, ou não, resultados reprodutivos mais promissores, quando são transferidos embriões não colapsados. Os restantes dados importados do software, consistiram na idade do paciente, na origem do sêmen, na técnica de fecundação utilizada, no tipo de eclosão assistida aplicada, no número de ovócitos que atingiram metáfase II, no número de embriões que apresentaram fecundação correta, no número de embriões que chegaram a blastocisto, no número de blastocistos colapsados, no número de embriões transferidos, no total de blastocistos colapsados que foram transferidos e na qualidade embrionária.

2.5. Seleção dos resultados reprodutivos

É essencial realizar uma seleção adequada de quais os resultados reprodutivos significantes para o estudo em questão. De acordo com a bibliografia, grande parte da incerteza em relação à prática laboratorial da técnica de eclosão assistida, reside no impacto desta técnica nas taxas de gravidez bioquímica e clínica, e nas taxas de nascimento vivo. Desta forma, os resultados reprodutivos selecionados para testar a influência desta técnica na primeira análise são o resultado do exame de deteção da β -hCG, o resultado da primeira ecografia gestacional após 1 mês da transferência, o número de sacos embrionários, a existência ou inexistência de um parto ou aborto e ainda, o tipo de parto.

No caso da segunda análise, utilizaram-se os mesmos resultados reprodutivos, à exceção da existência e do tipo de parto. De facto, os resultados reprodutivos mais apelativos para esta análise são as taxas de implantação, dado que se pretende inferir se a transferência embriões colapsados, compromete o seu potencial de implantação.

2.6. Análise estatística

A análise estatística neste estudo, pretende numa primeira instância, clarificar e correlacionar o impacto da eclosão assistida com diferentes resultados laboratoriais e reprodutivos. Posteriormente, também o papel da transferência de blastocistos colapsados foi analisado estatisticamente e relacionado com os resultados laboratoriais e reprodutivos.

A fim de determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre grupos, para cada um dos resultados de interesse, as variáveis quantitativas contínuas incluídas foram comparadas utilizando o teste t de Student.

Por outro lado, o teste χ^2 , foi utilizado para comparar as variáveis discretas. A análise estatística foi realizada com recurso a QuickCalc (GraphPad) e linguagem para computação estatística R. O poder estatístico foi outro dos parâmetros analisados com recurso a *post-hoc* Power Calculator.

Para cumprir com o primeiro objetivo deste trabalho, a análise estatística incidiu sobre a média da idade dos pacientes, uma variável contínua. Em contrapartida, os resultados laboratoriais relevantes para a análise, incluíram variáveis discretas como o grau de expansão dos blastocistos e a qualidade da MCI e da TE. Para os resultados

reprodutivos, as variáveis discretas utilizadas foram o número de β -hCG positiva, de ecografia positiva (ECO +) e o número e tipo de parto.

Já o estudo que concerne aos embriões colapsados, envolveu a média de idades dos pacientes, uma variável contínua. As variáveis discretas analisadas foram a origem do sêmen, a técnica de fecundação utilizada e o método de eclosão assistida aplicado. As restantes variáveis discretas dizem respeito aos resultados reprodutivos, entre elas, o número de β -hCG positiva, ECO + e o número de sacos embrionários.

3. Resultados

3.1. Prática da técnica de eclosão assistida

Os dados referentes às 354 ET encontram-se descritos na Tabela 2. É possível inferir através deste estudo retrospectivo, que se realizaram mais transferências sem se proceder a técnicas de eclosão assistida do que transferências em que se aplicou a técnica. De salientar que na população estudada, cerca de 85% das transferências foram efetuadas sem se praticar eclosão assistida nos respetivos embriões.

Como é visível na tabela 2, a distribuição das possíveis variáveis de confusão que foram incluídas neste estudo, como a idade do elemento feminino do casal, ou a qualidade embrionária são semelhantes tanto na população em que se aplicou eclosão assistida como na população de controlo. Deste modo, não é necessário realizar uma análise multivariada para avaliar o efeito da variável explicativa, eclosão assistida, nos resultados reprodutivos.

A análise estatística dos resultados reprodutivos/clínicos, revela que não existe uma diferença significativa entre grupos, o que é indicativo de que a realização de eclosão assistida não tenha beneficiado o número de gravidezes bioquímicas ou o número de partos atingidos na população de estudo.

Tabela 2. Caraterísticas da população e análise estatística do possível impacto da prática da técnica de eclosão assistida, nos resultados reprodutivos, nessa população. A Tabela 2 pretende uma clara comparação entre diferentes variáveis, quando se aplica eclosão assistida aos blastocistos, em oposição da não aplicação da técnica, numa fase anterior à sua transferência. As variáveis analisadas fazem-se acompanhar de valores discretos, para os quais foram calculadas as respetivas percentagens, igualmente abaixo apresentadas. As variáveis contínuas são representadas na tabela com a respetiva média e desvio padrão.

Variáveis discretas: N; Variáveis contínuas: $X \pm DP$	Com Eclosão Assistida	Sem Eclosão Assistida	P value
Total de transferências, N (%)	54 (15.3)	300 (84.8)	-
Idade de paciente (anos), $X \pm DP$	35.7 $\pm$ 4.2	36.4 $\pm$ 3.9	0.231
Parâmetros Laboratoriais			
Dia embrionário na transferência, $X \pm DP$	5.1 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.3	-
Blastocistos com grau de expansão < 2, N (%)	0 (0.0)	11 (3.7)	0.142
Blastocistos com grau de expansão 2, N (%)	23 (42.6)	77 (25.7)	
Blastocistos com grau de expansão 3, N (%)	19 (35.2)	137 (45.7)	
Blastocistos com grau de expansão 4, N (%)	12 (22.2)	75 (25.0)	0.547
Blastocistos com MCI 1, N (%)	40 (74.1)	238 (79.3)	
Blastocistos com MCI 2, N (%)	14 (25.9)	60 (20.0)	
Blastocistos com MCI 3, N (%)	0 (0.0)	2 (0.7)	0.838
Blastocistos com TE 1, N (%)	33 (61.1)	190 (63.3)	
Blastocistos com TE 2, N (%)	20 (37.0)	107 (35.7)	
Blastocistos com TE 3, N (%)	1 (1.9)	3 (1.0)	
Resultados Clínicos/Reprodutivos			
Beta hCG +, N (%)	36 (66.7)	195 (65.0)	0.813
ECO +, N (%)	22 (40.7)	149 (49.7)	0.227
Parto, N (%)	18 (33.3)	125 (41.7)	0.251
Tipo de parto			
Cesariana, N (%)	10 (55.6)	64 (51.2)	-
Vaginal, N (%)	8 (44.4)	61 (48.8)	-

3.2. Eclosão assistida em embriões colapsados

3.2.1. Caraterísticas da população amostral

Na Tabela 3, é possível visualizar as caraterísticas basais da população estudada em relação à ocorrência do evento de colapso embrionário. Nesta tabela constam informações relativas a um total de 51 pacientes, desde a média de idade, fator de infertilidade, origem do sémen até à técnica de fecundação utilizada. As causas de infertilidade mais frequentes nesta população são a causa idiopática, a oligozoospermia e a mono/homoparentalidade. Em contrapartida, as causas de infertilidade menos frequentes incluem o fator ovocitário, a oligoteratoastenospermia, a serodiscordância e a idade.

Apenas uma minoria dos tratamentos recorre a sémen de dador, sendo que 78.4% das amostras de sémen tem origem no cônjuge da respetiva paciente. Adicionalmente, a tabela revela que a técnica de fecundação mais utilizada neste estudo é a ICSI, seguida de fecundação mista e da FIV, sendo esta última representativa de 19.6% do total de fecundações observadas.

A tabela apresenta ainda diversos resultados laboratoriais e, entre estas variáveis, encontra-se o número total de ovócitos em metáfase II, o total de embriões a apresentar correta fecundação, o total de blastocistos, o total de blastocistos colapsados, o total de blastocistos utilizáveis e, por fim, a totalidade de blastocistos utilizáveis colapsados.

A informação mais relevante a retirar da tabela 3, é a prevalência do evento de colapso embrionário na população, que se encontra destacada a vermelho. O total de blastocistos colapsados, corresponde a cerca de 28.9% da totalidade dos blastocistos obtidos e o valor total de blastocistos utilizáveis colapsados é de cerca de 23.0% em relação a todos os blastocistos utilizáveis.

Tabela 3. Caraterísticas da população: as variáveis com potencial efeito no colapso embrionário e os respetivos resultados laboratoriais.

Variáveis discretas: N; variáveis contínuas: $X \pm DP$	Valor (%)
Pacientes, N	51
Idade de paciente (anos), $X \pm DP$	36.0 $\pm$ 3.6
Fator de infertilidade, N (%)	
Causa Idiopática	12 (23.5)
Oligozoospermia	7 (13.7)
Mono/homoparentalidade	6 (11.8)
Endometriose	4 (7.8)
Astenozoospermia	4 (7.8)
Azoospermia	4 (7.8)
Obstrução das trompas	2 (4.0)
Adenomiose	2 (4.0)
Miomas uterinos	2 (4.0)
Anovulação	2 (4.0)
Teratozoospermia	2 (4.0)
Fator ovocitário	1 (2.0)
Oligoteratoastenospermia	1 (2.0)
Casal serodiscordante	1 (2.0)
Idade	1 (2.0)
Origem do Sêmen, N (%)	
Cônjuge	40 (78.4)
Dador	11 (21.6)
Técnica de Fecundação, N (%)	
ICSI	23 (45.1)
FIV	10 (19.6)
FIV/ICSI 50%	18 (35.3)
Resultados Laboratoriais	
Total de ovócitos em Metáfase II; $X \pm DP$	603, 11.8 $\pm$ 5.7
Total com fecundação correta (2 Pronúcleos); $X \pm DP$	396, 7.8 $\pm$ 3.6
Total de Blastocistos; $X \pm DP$	242, 4.7 $\pm$ 2.9
Total de Blastocistos Colapsados; $X \pm DP$	70, 1.4 $\pm$ 1.2 (28.9)
Total de Blastocistos Utilizáveis; $X \pm DP$	213, 4.2 $\pm$ 2.6
Total de Blastocistos Utilizáveis Colapsados; $X \pm DP$	49, 1.0 $\pm$ 1.1 (23.0)

3.2.2. Resultados laboratoriais e clínicos das transferências embrionárias

Os resultados das transferências para o estudo do impacto do colapso embrionário encontram-se mencionados na Tabela 4. O estudo conta com 51 transferências e um total de 78 embriões transferidos. Os parâmetros laboratoriais consistem no grau de expansão e na qualidade da MCI e da TE, no tipo de técnica de eclosão assistida realizada, no total de blastocistos transferidos e na totalidade de blastocistos transferidos colapsados.

Encontra-se claramente evidenciado nesta tabela, que a maior parte dos blastocistos que foram transferidos apresentam grau de expansão 3 e possuem o nível de qualidade embrionária mais alto possível, em relação à MCI e à TE.

A tabela 4 revela também que a eclosão assistida foi aplicada a cerca de metade dos embriões, correspondendo a 49.0% dos casos. Não obstante, é possível verificar que o tipo de eclosão assistida maioritariamente utilizado envolve a abertura total da ZP, através da sua perfuração com auxílio de laser. Já a técnica de desbaste da ZP, mencionada na tabela como *Thinning*, apenas é aplicada a cerca de 11.8% dos embriões.

É importante salientar que apenas 13 dos 49 blastocistos utilizáveis colapsados foram selecionados para a ET. Na verdade, só 13/78 (16.6%) da totalidade dos embriões transferidos, correspondem a blastocistos colapsados, o que parece indicar uma preferência pela transferência de embriões que não sofreram nenhum evento de colapso embrionário.

Os resultados reprodutivos, destacados a vermelho na tabela abaixo, demonstram que 49.0% das transferências culminaram numa β -hCG positiva e 45.1% resultaram numa gravidez clínica.

Tabela 4. Transferências embrionárias e os respetivos parâmetros laboratoriais e resultados clínicos/reprodutivos.

Variáveis discretas: N; variáveis contínuas: $\bar{X} \pm DP$	Valor (%)
Total de transferências, N	51
Parâmetros Laboratoriais	
Total de embriões transferidos, N, $\bar{X} \pm DP$	78, 1.5 ± 0.5
Blastocistos com grau de expansão <2, N (%)	1 (1.3)
Blastocistos com grau de expansão 2, N (%)	18 (23.1)
Blastocistos com grau de expansão 3, N (%)	51 (65.4)
Blastocistos com grau de expansão 4, N (%)	8 (10.3)
Blastocistos com MCI 1, N (%)	72 (92.3)
Blastocistos com MCI 2, N (%)	5 (6.4)
Blastocistos com MCI 3, N (%)	1 (1.3)
Blastocistos com TE 1, N (%)	68 (87.2)
Blastocistos com TE 2, N (%)	9 (15.2)
Blastocistos com TE 3, N (%)	1 (1.3)
Técnica de Eclosão Assistida N (%)	
Eclosão	20 (39.2)
Thinning	6 (11.8)
Sem Eclosão Assistida	25 (49.0)
Total de blastocistos transferidos colapsados, N (%)	13 (16.6)
Resultados Clínicos/Reprodutivos	
Beta hCG +, N (%)	25 (49.0)
ECO +, N (%)	23 (45.1)
Nº de sacos, N	
0	27
1	15
2	8

3.2.3. Colapso embrionário nos resultados reprodutivos

A Tabela 5, apresenta uma comparação do desfecho das transferências em que pelo menos 1 embrião colapsado foi transferido, face à transferência de apenas embriões não colapsados. Tal como o indicado na tabela anterior, também a disposição desta tabela demonstra de forma clara que a maior parte dos embriões que são transferidos, correspondem a blastocistos não colapsados. De facto, dos 78 embriões transferidos, 65 são embriões que nunca sofreram colapso.

No entanto, o número de embriões transferidos aos quais foram aplicadas técnicas complementares à transferência (eclosão assistida), são semelhantes entre grupos, o que permite a comparação não enviesada dos resultados reprodutivos. Os valores dos mesmos, não apresentam diferenças estatisticamente significativas, o que assinala que a transferência de embriões colapsados não parece afetar o número de gravidezes bioquímicas ou clínicas, nem o número de sacos embrionários, sendo que o número de casos analisados neste estudo é muito baixo.

Tabela 5. Impacto do evento de colapso embrionário nos resultados reprodutivos após a transferência embrionária.

Variáveis discretas: N; variáveis contínuas: $X \pm DP$	Transferência de pelo menos 1 blastocisto colapsado	Transferência sem blastocistos colapsados	P Value
Total de transferências, N (%)	9 (17.6)	42 (82.4)	-
Total de embriões transferidos, N, $X \pm DP$	13, 1.4 $\pm$ 0.5	65, 1.5 $\pm$ 0.5	-
Técnica de Eclosão Assistida N (%)			0.523
Eclosão	5 (55.5)	15 (35.7))	
Thinning	1 (11.1)	5 (11.9)	
Sem Eclosão Assistida	3 (33.3)	22 (52.4)	
Resultados Clínicos/Reprodutivos			
Beta hCG +, N (%)	4 (44.4)	21 (50.0)	0.762
ECO +, N (%)	4 (44.4)	19 (45.2)	0.965
Nº de sacos, N (%)			0.903
0	5 (55.5)	23 (54.8)	
1	3 (33.3)	12 (28.6)	
2	1(11.1)	7(16.6)	

3.2.4. Fatores relacionados com o colapso embrionário

A Tabela 6 faz uma comparação entre alguns parâmetros laboratoriais dos pacientes a partir dos quais se obteve pelo menos um blastocisto colapsado, e dos pacientes que originaram apenas embriões não colapsados. A média da idade dos pacientes também foi analisada estatisticamente, mas os valores obtidos não têm significado estatístico, o que sugere a não existência de uma correlação entre a idade da mulher e o colapso embrionário.

A análise estatística inclui também a origem do sêmen e a técnica de fecundação utilizada. Em ambos os casos, a análise não demonstra significância estatística, o que aponta para a falta de correlação entre a ocorrência de colapso nos blastocistos e estas duas variáveis.

Tabela 6. Comparação de parâmetros laboratoriais, entre pacientes com pelo menos um blastocisto colapsado, e pacientes sem blastocistos colapsados.

Variáveis discretas: N; variáveis contínuas: $\bar{X} \pm DP$	Pacientes com pelo menos 1 blastocisto colapsado	Pacientes sem blastocistos colapsados	P Value
Pacientes, N (%)	38 (74.5)	13 (25.5)	0.0743
Media de idade de paciente (anos) $\bar{X} \pm DP$	35.5 $\pm$ 3.4	37.6 $\pm$ 4.1	
Origem do Sêmen, N (%)			0.878
Cônjuge	30 (78.9)	10 (76.9)	
Dador	8 (21.1)	3 (23.1)	
Técnica de Fecundação, N (%)			0.565
ICSI	16 (42.1)	7 (53.8)	
FIV	7 (18.4)	3 (23.1)	
FIV/ICSI 50%	15 (39.5)	3 (23.1)	

4. Discussão

A eclosão assistida

A análise estatística dos resultados reprodutivos, no presente estudo, demonstra a inexistência de qualquer benefício na realização de eclosão assistida, quer no número de gravidezes bioquímicas, quer no número de partos efetuados.

Existem diversos estudos já realizados que visam avaliar o impacto da eclosão assistida nos resultados reprodutivos sendo que, nem todos são concordantes com os resultados obtidos neste trabalho [107, 118, 119].

Enquanto estudos anteriores comprovam que a eclosão assistida, aplicada aos embriões descongelados, visa aumentar a probabilidade de desfecho de uma gravidez, estudos recentes parecem ir ao encontro dos resultados aqui apresentados.

Assim, apesar de uma comparação imediata entre este estudo, e o resto da bibliografia mencionada ser difícil, devido a vários *confounding factors*, como a qualidade embrionária, e as diferentes metodologias de eclosão assistida passíveis de ser aplicadas, esta técnica não tem sido associada a melhores resultados reprodutivos quando aplicada a embriões descongelados/congelados [120, 121].

Ademais, de acordo com alguns projetos de investigação, a taxa de nascimentos vivos, na sequência de eclosão assistida, em ciclos diferidos, chega mesmo a ser mais reduzida [122, 123].

Os critérios para a aplicação de eclosão assistida

Como mencionado acima, existe uma grande heterogeneidade relativamente às diferentes técnicas de eclosão assistida aplicadas numa fase pré transferência, em contexto clínico. Esta análise, inclui apenas ciclos diferidos e as respetivas transferências, contendo só os casos clínicos em que a eclosão assistida foi aplicada aos embriões após a sua descongelação.

De facto, a vitrificação e a posterior descongelação de embriões, é por si só utilizada em algumas clínicas como um critério singular para a realização de eclosão assistida [118]. Outros indicadores utilizados pelas clínicas de RHA para implementar a técnica de eclosão assistida antes da ET, incluem uma ZP espessa e embriões de pacientes que apresentam um fraco diagnóstico de fertilidade [106].

Não obstante, diferentes clínicas podem utilizar diferentes critérios para agrupar pacientes com um mau prognóstico de fertilidade, o que pode explicar a inconsistência na eficácia desta técnica para este grupo específico de pacientes [89].

Por exemplo, uma meta-análise de ensaios clínicos aleatórios concluiu que a eclosão assistida só permite alcançar melhores resultados reprodutivos em mulheres que tenham experienciado anteriormente falhas repetidas na implantação, ao invés de mulheres em idade avançada [107]. Por outro lado, outro estudo sugeriu que o fracasso repetido da implantação, não é só por si um indicador para a eclosão assistida e que o uso desta técnica em embriões de pacientes mais jovens, pode dificultar a implantação [108].

No entanto, nem todos os centros de infertilidade aplicam eclosão assistida previamente à ET, sendo a sua principal motivação a ausência de indícios elementares que comprovem a eficácia desta técnica. De facto, uma análise extensiva de dados referentes à prática clínica atual de eclosão assistida verificou que a aplicação de eclosão assistida previamente à ET é implementada em apenas 65% das clínicas que efetuam tratamentos avançados de RHA [106].

Em contrapartida, é compreensível que pacientes com um mau prognóstico procurem toda a intervenção médica possível para conseguir atingir uma gravidez viável. Deste modo, até dispormos de evidências consistentes e devidamente validadas, as clínicas podem implementar eclosão assistida nos ciclos de RHA, a fim de satisfazer as petições dos seus pacientes, logo que estes estejam plenamente informados sobre potenciais riscos e perspetivas de sucesso.

Também os resultados deste estudo, indicam que a eclosão assistida é uma técnica que não é aplicada em larga escala após a descongelação dos embriões e antes da transferência intrauterina, restringindo-se apenas a 15% dos casos nesta população. Nomeadamente, na clínica Ginemed, esta técnica apenas é realizada quando solicitada pelo paciente ou por preferência médica.

Em relação ao dia embrionário de transferência, esta análise incluiu apenas embriões que atingiram a fase de blastocisto em dia embrionário 5 ou 6, não tendo sido averiguado se existe algum benefício ou desvantagem, na aplicação de eclosão assistida em embriões que se encontrem numa fase mais precoce do seu desenvolvimento.

No entanto, atualmente existe uma tendência progressiva para desempenhar eclosão assistida apenas em blastocistos, devido ao elevado grau de precisão e de controlo que é proporcionado pela utilização de lasers. Desta forma a execução de eclosão assistida na fase blastocitária é facilitada.

De acordo com o mencionado anteriormente, esta análise revelou também que fatores como a idade média das pacientes e qualidade embrionária, não são considerados

como marcadores clínicos individuais para a realização de eclosão assistida. É ainda de salientar que o facto de estas variáveis independentes não apresentarem diferenças significativas, permitiram uma melhor comparação entre as variáveis dependentes presentes neste estudo (ECO +, Parto).

Limitações da análise

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas em ambos os resultados reprodutivos aqui analisados, estes valores apresentam significância clínica uma vez que, a percentagem de partos obtidos quando é aplicada eclosão assistida é de 33% e quando a técnica não é aplicada, esta percentagem aumenta para os 42%.

Uma análise *post-hoc* do poder estatístico do tamanho amostral, indica que o número de pacientes incluídos no presente estudo, só atingiria significância estatística perante uma diferença de 22.8% entre grupos, sendo que esta é uma limitação habitual encontrada em estudos retrospectivos. Adicionalmente, os resultados observados nesta análise podem ser subjacentes a outros *confounding factors*, que não foram possíveis de avaliar. Estes fatores incluem o historial prévio de tratamentos de RHA dos pacientes, tendo em conta que pacientes com repetidas falhas de implantação estão mais suscetíveis de recorrer a técnicas complementares, como a eclosão assistida.

Atualmente não existe um protocolo *standard* aplicável à eclosão assistida, mas é consensual, que esta técnica deve ser aplicada a pacientes com indicadores clínicos específicos e não a uma população universal de indivíduos. Ainda assim, é importante que a eclosão assistida continue a ser aplicada, com cautela, aos embriões de uma população específica, sempre em contexto de investigação. A permanência da técnica em RHA é extremamente relevante e tendo em conta a considerável disparidade na prática de eclosão assistida, os critérios de inclusão de pacientes e a natureza complexa da gravidez, é possível que os benefícios desta técnica estejam camuflados numa população de pacientes não adequada para a sua realização.

O Colapso Embrionário

Através dos resultados deste estudo, é possível verificar que cerca de 29% da totalidade dos blastocistos sofreram eventos de colapso. Adicionalmente, observou-se que 23% dos blastocistos, considerados como sendo utilizáveis, correspondem a blastocistos colapsados.

Não obstante, os resultados apresentados evidenciam claramente que grande parte dos embriões que foram transferidos não colapsaram durante o seu desenvolvimento. Na realidade, apenas cerca de 17% dos embriões transferidos correspondem a embriões colapsados.

Este acontecimento pode estar relacionado com a preferência pela transferência de embriões não colapsados, dado que através da monitorização do desenvolvimento embrionário, pela tecnologia de *time lapse*, o colapso espontâneo dos blastocistos tem sido descrito como um novo elemento associado à viabilidade embrionária e aos desfechos reprodutivos [124, 125].

De notar que, apesar de existirem mais pacientes a originar blastocistos colapsados que pacientes a gerar blastocistos em que não se verificou nenhum evento de colapso (26%), a grande parte dos embriões transferidos foram os não colapsados (82%).

Por conseguinte, o colapso embrionário pode ser um parâmetro adicional a ter em consideração aquando da seleção de um único blastocisto para transferir, sobretudo quando a paciente dispõe de diversos blastocistos destinados à transferência.

O Colapso Embrionário nos Resultados Reprodutivos

Na totalidade da população deste estudo, onde foram realizadas apenas transferências de embriões congelados, observaram-se percentagens de gravidez bioquímica e gravidez clínica de 49% e 45%, respetivamente.

Já a transferência de embriões colapsados, resultou numa taxa de gravidez bioquímica e clínica, de cerca de 44%, enquanto a transferência de blastocistos não colapsados, culminou numa taxa de gravidez bioquímica e clínica de 50% e 45%, respetivamente.

Apesar de se verificarem taxas reprodutivas ligeiramente superiores após a transferência de blastocistos não colapsados, as diferenças não foram estatisticamente significativas em nenhum dos resultados reprodutivos, entre os dois grupos em estudo. É de salientar que, a maioria dos embriões transferidos, apresentavam boa qualidade embrionária, o que permite anular o seu papel como uma variável de confusão e obter

uma melhor interpretação dos resultados reprodutivos, relativamente ao evento de colapso.

A prevalência e os fatores relacionados com o colapso embrionário

Estudos retrospectivos, demonstram resultados com valores similares àqueles que foram obtidos nesta análise, em que cerca de 20% dos embriões colapsaram pelo menos uma vez, durante o seu desenvolvimento [124]. A percentagem ligeiramente mais elevada encontrada neste estudo, pode ser explicada devido a um número bastante inferior de ciclos analisados, comparativamente a populações maiores como a do estudo previamente mencionado.

Apesar dos mecanismos moleculares subjacentes ao evento de colapso embrionário ainda serem parcialmente incompreendidos, sabe-se que este fenómeno consiste em uma ou mais contrações, causadas pelo efluxo e absorção sequenciais do fluído presente no blastocélio [113].

O colapso é de facto, a consequência de uma alta pressão osmótica e de baixa bombagem. Como tal, a principal causa do colapso embrionário e os subseqüentes eventos de reexpansão podem dever-se a uma regulação defeituosa destes mecanismos. Esta incorreta regulação pode estar associada a uma expressão génica anormal ou a padrões de divisão celular irregulares, que por sua vez resultam na disrupção das junções das *tight junctions* entre as células da TE [126].

Neste estudo, analisou-se a média de idades das pacientes, a origem do sêmen e a técnica de fecundação utilizada. Não foi encontrada significância estatística, em nenhuma destas variáveis, entre o grupo de pacientes que originou embriões colapsados e o grupo de pacientes que não obteve nenhum colapso embrionário.

Estes resultados, vão ao encontro de trabalhos anteriores, que demonstram que a idade feminina não influencia diretamente a ocorrência de colapso embrionário [112].

Um estudo realizado este ano, demonstrou evidências de uma associação entre o colapso espontâneo dos blastocistos e uma menor aptidão para o correto desenvolvimento embrionário, independentemente da competência integral da coorte de oócitos MII de que deriva. A investigação revelou, que os blastocistos colapsados estão de facto mais sujeitos a sofrer degeneração, a ter um desenvolvimento retardado, a apresentar uma qualidade morfológica reduzida e a taxas de aneuploidia superiores [127].

É necessária mais investigação a fim de revelar quais os mecanismos moleculares e as forças físicas que regulam a expansão dos blastocistos, o colapso e a dinâmica de

reexpansão. Assim, permanece em aberto se o colapso espontâneo dos blastocistos é um evento indicativo de uma baixa aptidão inerente a cada embrião, um mecanismo de resposta ao stress, ou ainda, o produto de uma menor qualidade intrínseca nos gâmetas de origem.

Colapso embrionário na implantação

Relativamente aos resultados reprodutivos, segundo os dados apresentados pelo 22º relatório da ESHRE, no ano de 2018, a taxa de gravidez clínica resultante de ciclos de TEC, rondou em média os 34% [128]. Como mencionado anteriormente, estas diferenças não são clinicamente significativas, tendo em consideração que a taxa de 45% obtida neste estudo é normal, visto que apenas foram analisadas 51 transferências. De acordo com um estudo realizado em 2015, a incidência de colapso espontâneo de um blastocisto diminui o potencial de implantação de 48,5% para 35.1% [113]. Mais recentemente, os resultados da investigação de *Sciorio et al.*, relataram taxas de implantação e de gravidez clínica significativamente mais elevadas, quando foram transferidos os blastocistos que não tinham colapsado aquando do seu desenvolvimento[125]. Outro estudo, publicado em 2022, relatou a existência de um efeito adverso nas taxas de gravidez em embriões com colapso, observando a redução da taxa de gravidez clínica de 61% para 48% [116].

Segundo todos estes estudos, é provável que os blastocistos humanos que colapsam espontaneamente durante o seu desenvolvimento, sejam menos propensos a implantar e gerar uma gravidez, comparativamente a embriões em que não se observem eventos de colapso.

Limitações do estudo

Também os dados relatados neste estudo, culminaram em taxas reprodutivas ligeiramente inferiores quando se transferiram embriões colapsados. No entanto, a análise estatística demonstrou claramente que estes resultados não eram significativos, sendo impossível concluir se o colapso embrionário diminui efetivamente as taxas reprodutivas.

O facto deste estudo não ter obtido resultados consistentes com os já mencionados, pode estar relacionado com o baixo poder estatístico da população. Para além disto, estas discrepâncias podem ainda ser explicadas mediante a existência de um perfil radicalmente diferente dos pacientes analisados entre estudos.

Assim, perante a pequena população aqui analisada, é impossível aferir se os eventos de colapso embrionário afetam diretamente o potencial de implantação dos embriões.

Aplicação de eclosão assistida em embriões colapsados

Através da análise da tabela 4, é ainda possível retirar informação relativamente à frequência com que são efetuadas as duas técnicas de eclosão assistida praticadas na clínica. Assim, nesta população, verificou-se que a técnica de abertura total da ZP é aplicada mais frequentemente que o *Thinning*.

No entanto, o mesmo estudo retrospectivo mencionado anteriormente revelou que tanto a perfuração completa da ZP, como o seu desbaste, são técnicas igualmente utilizadas para a realização de eclosão assistida, prévia à ET [106].

Ainda que, a eficácia clínica de ambas as técnicas já tenha sido amplamente estudada, subsiste a incerteza de qual das técnicas permite alcançar um melhor resultado reprodutivo.

Determinados estudos populacionais, revelaram que as duas vias têm efeitos similares, em termos das taxas de implantação e de gravidez clínica [129-131], porém outros propõem que o *Thinning* seja associado a um melhor resultado clínico [132]. De facto, existem diferentes publicações descritivas do benefício de efetuar o desbaste de 25% do perímetro da ZP, relativamente a determinados grupos de pacientes e em ciclos de TEC [133].

Por outro lado, um trabalho demonstrou que a abertura total da zona, auxilia o processo de eclosão em embriões de ratos, ao contrário do que se verifica no processo de desbaste da ZP [134].

Todas estas observações devem ser consideradas para implementar uma adequada metodologia na aplicação clínica das técnicas de eclosão assistida, via laser, no contexto de RHA.

Nesta análise, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de embriões colapsados e o grupo de embriões não colapsados, no que diz respeito à aplicação das diferentes técnicas de eclosão assistida.

Assim, apesar de estudos recentes, apontarem para o potencial benefício da prática de eclosão assistida em embriões colapsados, os resultados desta análise demonstram que esta constatação é muito recente, e como tal, apresenta escassos dados para a corroborar, não sendo posta em prática na clínica Ginemed [116, 135].

5. Conclusão

Este trabalho tinha como principais objetivos aferir sobre o impacto da eclosão assistida nos resultados reprodutivos e procurar deduzir a influência que os eventos de colapso embrionário têm no desfecho reprodutivo.

Para uma melhor compreensão do projeto de investigação aqui apresentado, dada a sua especificidade, foi elaborada uma pequena introdução sobre o tema. Esta introdução inicia-se com o esclarecimento de conceitos básicos de infertilidade e uma abordagem acessível sobre as diferentes técnicas de RHA, a cultura dos embriões e a sua transferência e ainda a criopreservação de embriões excedentários.

De seguida, foi descrita a função e fisiologia da ZP, o processo de eclosão *in vivo* e o consequente aparecimento da eclosão assistida. Foram igualmente exploradas as diferentes técnicas aplicadas em contexto clínico, as suas vantagens e desvantagens. Por fim, e tendo em consideração o segundo objetivo deste trabalho, foi apresentada a essência e caracterização do evento de colapso embrionário, bem como o potencial benefício da aplicação de eclosão assistida em embriões colapsados.

O primeiro objetivo deste trabalho pode-se considerar atingido, visto que a análise estatística demonstrou a inexistência de uma correlação entre a prática de eclosão assistida e as variáveis dependentes (Beta hCG +, ECO +, Parto). Apesar destes resultados estarem de acordo com as comprovações realizadas em trabalhos recentes, é preciso ter em consideração o baixo poder estatístico da população presente neste estudo. Ainda assim, a população selecionada apresentou aspetos favoráveis para a análise, como a idade média da paciente, o dia embrionário da transferência e a qualidade embrionária, que demonstraram ser variáveis com valores semelhantes entre o grupo de controlo e o grupo onde se aplicou a técnica de eclosão assistida.

De facto, a principal condicionante que resultou no baixo poder estatístico da população estudada, residiu no facto de terem sido analisados consideravelmente mais ciclos onde a técnica não foi aplicada. Tendo em consideração que este estudo é de natureza retrospectiva, esta é uma condicionante usual neste tipo de trabalhos, visto que os dados disponíveis estão dependentes daquilo que é a prática diária nos laboratórios de RHA da Ginemed.

Já para a concretização do segundo objetivo proposto, a análise contou com 51 ET, onde se verificou a falta de uma relação estatisticamente significativa entre o colapso embrionário e os resultados reprodutivos avaliados. No entanto, devido ao número extremamente baixo de embriões colapsados que foram efetivamente transferidos (13), era expectável que estes resultados fossem discordantes com a bibliografia atual, sendo

difícil fazer sentido a dados reais. Este estudo reforça que a eclosão assistida é um método complementar, relativamente seguro, que pode ser benéfico quando utilizado em pacientes criteriosamente selecionados. Desta forma, a aplicação de eclosão assistida via laser, a uma população geral de pacientes, não é aconselhável e não se traduz necessariamente em melhores taxas reprodutivas.

São necessários novos modelos de estudo da fase inicial do desenvolvimento embrionário e uma padronização no protocolo de aplicação de eclosão assistida, a fim de reduzir a disparidade nítida que ocorre na prática clínica desta técnica.

Entretanto, é recomendado que os investigadores e as diferentes clínicas colaborem usando bioestatística para o tratamento de dados, com o intuito de facilitar e orientar a aplicação de eclosão assistida na prática clínica, ao avaliar a eficácia e segurança desta técnica de uma forma mais abrangente.

6. Considerações Finais

O estágio curricular que realizei na clínica Ginemed Lisboa, permitiu acompanhar de perto aquela que é a rotina diária dos laboratórios de RHA. No âmbito deste estágio, ao longo de 6 meses, tive ainda a oportunidade de adquirir diversas competências laboratoriais inerentes a esta área tão meticulosa e desafiante que é a RHA.

As primeiras capacidades que desenvolvi foram ao nível do laboratório de andrologia, onde foi possível a realização autónoma de exame e processamento de amostras de esperma, e a criopreservação destas amostras. No laboratório de embriologia, foi possível assistir e acompanhar embriologistas experientes desde o processo de recolha dos gametas femininos, na punção folicular, até à seleção e respetiva ET.

Foi ainda exequível o treino da técnica de triagem de complexos cúmulo-ovócito e avaliar o estado de maturidade dos oócitos, com acompanhamento. Igualmente, realizei o processamento de amostras seminais para as técnicas de inseminação FIV e ICSI.

À posteriori, recorrendo ao material biológico excedentário da clínica, desenvolvi aptidões como o carregamento de cateteres de transferência e desenvolvi algum treino na vitrificação e descongelação de ovócitos. De igual forma, tive a oportunidade de utilizar o material excedentário para começar a desenvolver alguma experiência no manuseamento do microscópio de ICSI e realizar no mesmo, a seleção espermática e a microinjeção.

Tive ainda a oportunidade única de assistir a técnicas exigentes e menos usuais na rotina de um laboratório de RHA, como a realização de biópsia testicular e de biópsia embrionária para PGT. Ademais, foi possível contribuir na manutenção dos meios e

materiais e auxiliar no registo da informação na base de dados da clínica. Adicionalmente, foi-me permitindo e encorajado comparecer nas reuniões semanais da equipa de laboratório, o que reforçou a minha perceção sobre a complexidade da área de RHA e da extrema responsabilidade e rigor que os profissionais desta área dispõem. Para além das competências laboratoriais mencionadas acima, o projeto de investigação proporcionou-me o aperfeiçoamento e consolidação da aquisição de competências relativas à avaliação da qualidade embrionária. Através deste estudo retrospectivo, foi possível ficar familiarizada com o software do equipamento de *time-lapse* Geri+ e simultaneamente, observar rigorosamente as fases mais precoces do desenvolvimento embrionário.

A realização deste trabalho foi ainda essencial na contribuição para a caracterização de eventos de colapso de embrionário e na aquisição de informação sobre uma das técnicas complementares mais debatidas em RHA, a eclosão assistida.

Este estágio teve um balanço positivo, demonstrando-me a complexidade e a desafiante gestão emocional que advém do contacto direto com os pacientes. É também devido ao papel ativo que os profissionais têm na realização do sonho de tantos casais, que esta é uma área que requer empenho e dedicação, mas que é acima de tudo, extremamente gratificante.

Referências Bibliográficas

1. *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting*. Human reproduction, 2011. **26**(6): p. 1270-1283.
2. Gardner, D.K. and B. Balaban, *Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important?* MHR: Basic science of reproductive medicine, 2016. **22**(10): p. 704-718.
3. Malter, H.E. and J. Cohen, *Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos*. Gamete research, 1989. **24**(1): p. 67-80.
4. Familiari, G., et al., *Structural changes of the zona pellucida during fertilization and embryo development*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 6730-6751.
5. García-Jiménez, M., et al., *Evaluation of the impact of laser-assisted hatching techniques on the hatching process of mouse blastocysts using time-lapse microscopy*. F&S Science, 2021. **2**(1): p. 43-49.
6. Davidson, L.M., et al., *Laser technology in the ART laboratory: a narrative review*. Reproductive BioMedicine Online, 2019. **38**(5): p. 725-739.
7. Zegers-Hochschild, F., et al., *The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009*. Human reproduction, 2009. **24**(11): p. 2683-2687.
8. Cousineau, T.M. and A.D. Domar, *Psychological impact of infertility*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2007. **21**(2): p. 293-308.
9. Sharma, R.S., R. Saxena, and R. Singh, *Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective*. The Indian journal of medical research, 2018. **148**(Suppl 1): p. S10.
10. Council, T.W.s.H., *Infertility and its treatments: A review of psycho social issues*. 2009, The Women's Health Council.

11. Zegers-Hochschild, F., et al., *The international glossary on infertility and fertility care*, 2017. Human reproduction, 2017. **32**(9): p. 1786-1801.
12. Boivin, J., et al., *International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care*. Human reproduction, 2007. **22**(6): p. 1506-1512.
13. Sartorius, G.A. and E. Nieschlag, *Paternal age and reproduction*. Human reproduction update, 2010. **16**(1): p. 65-79.
14. Wyns, C., et al., *ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE*. Human reproduction open, 2021. **2021**(3): p. hoab026.
15. <RELATORIO_ATIVIDADE_PMA2018.pdf>. 2021. Retrieved from: https://www.cnpma.org.pt/cnpma/Documents/RelatoriosAtividadeEmPma/RELATORIO_ATIVIDADE_PMA2018.pdf
16. Walker, M.H. and K.J. Tobler, *Female Infertility*. 2020.
17. Dun, E.C. and C.H. Nezhat, *Tubal factor infertility: diagnosis and management in the era of assisted reproductive technology*. Obstetrics and Gynecology Clinics, 2012. **39**(4): p. 551-566.
18. Prescott, J., et al., *A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility*. Human Reproduction, 2016. **31**(7): p. 1475-1482.
19. Medicine, P.C.o.t.A.S.f.R., *Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion*. Fertility and sterility, 2012. **98**(2): p. 302-307.
20. Naz, M. and M. Kamal, *Classification, causes, diagnosis and treatment of male infertility: a review*. Oriental pharmacy and experimental medicine, 2017. **17**(2): p. 89-109.
21. Jukic, M., et al., *Laparoscopic versus open high ligation for adolescent varicocele: A 6-year single center study*. Indian Pediatrics, 2019. **56**(8): p. 653-658.
22. Bayer, S., *The Boston IVF handbook of infertility: a practical guide for practitioners who care for infertile couples*. 2017: CRC Press.
23. Sabarre, K.-A., et al., *A qualitative study of Ottawa university students' awareness, knowledge and perceptions of infertility, infertility risk factors and assisted reproductive technologies (ART)*. Reproductive Health, 2013. **10**(1): p. 1-10.

24. Bala, R., et al., *Environment, lifestyle, and female infertility*. Reproductive Sciences, 2021. **28**(3): p. 617-638.
25. Durairajanayagam, D., *Lifestyle causes of male infertility*. Arab journal of urology, 2018. **16**(1): p. 10-20.
26. Johnson, S.L., et al., *Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis*. Ageing research reviews, 2015. **19**: p. 22-33.
27. Anderson, K., V. Nisenblat, and R. Norman, *Lifestyle factors in people seeking infertility treatment—a review*. Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology, 2010. **50**(1): p. 8-20.
28. Devroey, P., et al., *Approaches to improve the diagnosis and management of infertility*. Human Reproduction Update, 2009. **15**(4): p. 391-408.
29. Cohen, M., *Intrauterine insemination*. International journal of fertility, 1962. **7**: p. 235-240.
30. Cohlen, B., et al., *IUI: review and systematic assessment of the evidence that supports global recommendations*. Human reproduction update, 2018. **24**(3): p. 300-319.
31. Boomsma, C.M., et al., *Semen preparation techniques for intrauterine insemination*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2004(3).
32. Ruiter-Ligeti, J., C. Agbo, and M. Dahan, *The impact of semen processing on sperm parameters and pregnancy rates with intrauterine inseminations*. Minerva ginecologica, 2017. **69**(3): p. 218.
33. Ragni, G., E. Somigliana, and W. Vegetti, *Timing of intrauterine insemination: where are we?* Fertility and sterility, 2004. **82**(1): p. 25-26.
34. van Rumste, M.M., et al., *The influence of the number of follicles on pregnancy rates in intrauterine insemination with ovarian stimulation: a meta-analysis*. Human reproduction update, 2008. **14**(6): p. 563-570.
35. Green, K.A., et al., *Progesterone luteal support after ovulation induction and intrauterine insemination: an updated systematic review and meta-analysis*. Fertility and Sterility, 2017. **107**(4): p. 924-933. e5.
36. Homburg, R., *The case for initial treatment with intrauterine insemination as opposed to in vitro fertilization for idiopathic infertility*. Human Fertility, 2003. **6**(3): p. 122-124.

37. Mohammadi, F., et al., *Relationship between sperm parameters and clinical outcomes of Intra Uterine Insemination (IUI)*. Caspian journal of internal medicine, 2021. **12**(1): p. 70.
38. Group, T.E.C.W., *Intrauterine insemination*. Human Reproduction Update, 2009. **15**(3): p. 265-277.
39. Kamel, R.M., *Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown*. Journal of reproduction & infertility, 2013. **14**(3): p. 96.
40. Meyer, C.G., *Conventional IVF*, in *Textbook of Assisted Reproduction*. 2020, Springer. p. 779-786.
41. Huang, J.Y.J. and Z. Rosenwaks, *Assisted reproductive techniques*, in *Human Fertility*. 2014, Springer. p. 171-231.
42. Yuzpe, A.A., Z. Liu, and M.R. Fluker, *Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)—salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure*. Fertility and sterility, 2000. **73**(6): p. 1115-1119.
43. O'Neill, C., et al., *Development of ICSI*. Reproduction, 2018. **156**(1): p. F51-F58.
44. Rubino, P., et al., *The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects*. Human reproduction update, 2016. **22**(2): p. 194-227.
45. Berntsen, S., et al., *In vitro fertilisation (IVF) versus intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in patients without severe male factor infertility: study protocol for the randomised, controlled, multicentre trial INVICSI*. BMJ open, 2021. **11**(6): p. e051058.
46. Lane, M. and D.K. Gardner, *Embryo culture medium: which is the best?* Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2007. **21**(1): p. 83-100.
47. Mantikou, E., et al., *Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review*. Human reproduction update, 2013. **19**(3): p. 210-220.
48. Stimpfel, M., et al., *The influence of the type of embryo culture media on the outcome of IVF/ICSI cycles*. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2020. **59**(6): p. 848-854.
49. Kleijkers, S.H., et al., *Ammonium accumulation in commercially available embryo culture media and protein supplements during storage at 2–8 C*

- and during incubation at 37 C.* Human Reproduction, 2016. **31**(6): p. 1192-1199.
50. Meseguer, M., et al., *The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation†.* Human Reproduction, 2011. **26**(10): p. 2658-2671.
 51. Mains, L. and B.J. Van Voorhis, *Optimizing the technique of embryo transfer.* Fertility and sterility, 2010. **94**(3): p. 785-790.
 52. Ligon, S., et al., *Comparison of Embryo Transfer Techniques in Assisted Reproductive Technology (ART) Cycles.* Journal of Infertility and Reproductive Biology, 2022. **10**(1): p. 15-18.
 53. Krampfl, E., et al., *Air in the uterine cavity after embryo transfer.* Fertility and sterility, 1995. **63**(2): p. 366-370.
 54. Moreno, V., et al., *Air in the transfer catheter does not affect the success of embryo transfer.* Fertility and sterility, 2004. **81**(5): p. 1366-1370.
 55. Coskun, S., et al., *Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial.* Human Reproduction, 2000. **15**(9): p. 1947-1952.
 56. Gerris, J.M., *Single embryo transfer and IVF/ICSI outcome: a balanced appraisal.* Human Reproduction Update, 2005. **11**(2): p. 105-121.
 57. Zaat, T., et al., *Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction.* Cochrane Database of Systematic Reviews, 2021(2).
 58. Nagy, Z.P., D. Shapiro, and C.-C. Chang, *Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment.* Fertility and sterility, 2020. **113**(2): p. 241-247.
 59. Rienzi, L., et al., *Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance.* Human reproduction update, 2017. **23**(2): p. 139-155.
 60. Shi, Y., et al., *Transfer of fresh versus frozen embryos in ovulatory women.* New England Journal of Medicine, 2018. **378**(2): p. 126-136.
 61. Ferraretti, A., et al., *Elective cryopreservation of all pronucleate embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: efficiency and safety.* Human Reproduction, 1999. **14**(6): p. 1457-1460.
 62. Chen, Z.-J., et al., *Fresh versus frozen embryos for infertility in the polycystic ovary syndrome.* N engl j med, 2016. **375**: p. 523-533.

63. Wassarman, P.M. and E.S. Litscher, *Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida*. International Journal of Developmental Biology, 2004. **52**(5-6): p. 665-676.
64. Wassarman, P.M. and E.S. Litscher, *Female fertility and the zona pellucida*. Elife, 2022. **11**: p. e76106.
65. Baena, V. and M. Terasaki, *Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 1-13.
66. Pan, C. and H. Zhang, *Embryological Characteristics and Clinical Outcomes of Oocytes with Heterogeneous Zona Pellucida During Assisted Reproduction Treatment: A Retrospective Study*. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2020. **26**: p. e924316-1.
67. Wassarman, P.M. and E.S. Litscher, *Zona pellucida genes and proteins: Essential players in mammalian oogenesis and fertility*. Genes, 2021. **12**(8): p. 1266.
68. Hammadeh, M.E., C. Fischer-Hammadeh, and K.R. Ali, *Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2011. **28**(2): p. 119-128.
69. Kirkegaard, K., J.J. Hindkjaer, and H.J. Ingerslev, *Hatching of in vitro fertilized human embryos is influenced by fertilization method*. Fertility and sterility, 2013. **100**(5): p. 1277-1282. e2.
70. Alteri, A., et al., *ALADDIN study: does assisted hatching of vitrified/warmed blastocysts improve live birth rate? Protocol for a multicentric randomised controlled trial*. BMJ open, 2020. **10**(7): p. e031544.
71. Kovacs, G., A. Rutherford, and D.K. Gardner, *How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success*. 2019.
72. Kilani, S.S., et al., *Do age and extended culture affect the architecture of the zona pellucida of human oocytes and embryos?* Zygote, 2006. **14**(1): p. 39-44.
73. Garside, W.T., et al., *Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: correlation with embryo quality, age, and*

- implantation*. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 1997. **47**(1): p. 99-104.
74. Cohen, J., S. Lindheim, and M. Sauer, *Assisted hatching causes beneficial effects on the outcome of subsequent frozen embryo transfers of donor oocyte cycle*. Fertil Steril, 1999. **72**: p. S5.
75. Kanyo, K., et al., *The impact of laser-assisted hatching on the outcome of frozen human embryo transfer cycles*. Zygote, 2016. **24**(5): p. 742-747.
76. Lacey, L., et al., *Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI))*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2021(3).
77. Cohen, J., et al., *Partial zona dissection or subzonal sperm insertion: microsurgical fertilization alternatives based on evaluation of sperm and embryo morphology*. Fertility and Sterility, 1991. **56**(4): p. 696-706.
78. Cohen, J., et al., *Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation*. Fertility and Sterility, 1989. **51**(5): p. 820-827.
79. Schiewe, M., et al., *Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos*. Journal of assisted reproduction and genetics, 1995. **12**(1): p. 2-7.
80. Cohen, J., *Assisted hatching of human embryos*. Journal of in vitro fertilization and embryo transfer, 1991. **8**(4): p. 179-190.
81. Schiewe, M.C., et al., *Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model*. Fertility and sterility, 1995. **63**(2): p. 288-294.
82. Rink, K., et al. *Zona pellucida drilling by a 1.48-um laser: influence on the biomechanics of the hatching process*. in *Laser-Tissue Interaction and Tissue Optics*. 1996. International Society for Optics and Photonics.
83. Liu, H.-C., et al., *Assisted hatching facilitates earlier implantation*. Fertility and Sterility, 1993. **60**(5): p. 871-875.
84. Mercader, A., et al., *An analysis of spontaneous hatching in a human endometrial epithelial coculture system: is assisted hatching justified?* Journal of assisted reproduction and genetics, 2001. **18**(6): p. 315-319.

85. Al-Nuaim, L.A. and J.M. Jenkins, *Assisted hatching in assisted reproduction*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2002. **109**(8): p. 856-862.
86. Cohen, J., et al., *Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation*. Human Reproduction, 1990. **5**(1): p. 7-13.
87. De Vos, A. and A. Van Steirteghem, *Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction*. Cells Tissues Organs, 2000. **166**(2): p. 220-227.
88. Germond, M., et al., *Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48 μ m diode laser beam: efficacy and safety of the procedure*. Fertility and Sterility, 1995. **64**(3): p. 604-611.
89. Seif, M.M., et al., *Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI)*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2005(4).
90. Cohen, J., et al., *Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration*. The Lancet, 1988. **332**(8603): p. 162.
91. Cohen, J. and D. Feldberg, *Effects of the size and number of zona pellucida openings on hatching and trophoblast outgrowth in the mouse embryo*. Molecular Reproduction and Development, 1991. **30**(1): p. 70-78.
92. Blake, D., et al., *Laser zona pellucida thinning—an alternative approach to assisted hatching*. Human Reproduction, 2001. **16**(9): p. 1959-1964.
93. Nijs, M., P. Vanderzwalman, and G. Bertin, *Pregnancies obtained after zona softening of in vitro cultured or frozen-thawed human embryos*. Hum Reprod, 1992. **7**: p. 82.
94. Cohen, J., et al., *Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis*. Human Reproduction, 1992. **7**(5): p. 685-691.
95. Tucker, M.J., et al., *Chemical removal of the outside of the zona pellucida of day 3 human embryos has no impact on implantation rate*. Journal of assisted reproduction and genetics, 1993. **10**(3): p. 187-191.
96. Tadir, Y., *Ten years of laser-assisted gametes and embryo manipulations*. Photomedicine in gynecology and reproduction. Basel: Karger, 2000: p. 326-39.

97. Laufer, N., et al., *The efficacy and safety of zona pellucida drilling by a 193-nm excimer laser*. Fertility and sterility, 1993. **59**(4): p. 889-895.
98. Strohmer, H. and W. Feichtinger, *Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program*. Fertility and Sterility, 1992. **58**(1): p. 212-214.
99. Tadir, Y., et al., *Lasers for gamete micromanipulation: basic concepts*. Journal of assisted reproduction and genetics, 1993. **10**(2): p. 121-125.
100. Nakayama, T., et al., *A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator*. Fertility and sterility, 1998. **69**(4): p. 784-788.
101. Hellebaut, S., et al., *Does assisted hatching improve implantation rates after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in all patients? A prospective randomized study*. Journal of assisted reproduction and genetics, 1996. **13**(1): p. 19-22.
102. Tucker, M., et al., *Infertility: Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection: does co-culture or assisted hatching improve implantation rates? Human Reproduction*, 1996. **11**(11): p. 2434-2437.
103. Li, D., et al., *Effect of assisted hatching on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-9.
104. Alteri, A., et al., *Revisiting embryo assisted hatching approaches: a systematic review of the current protocols*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2018. **35**(3): p. 367-391.
105. Hurst, B.S., et al., *Assisted hatching does not enhance IVF success in good-prognosis patients*. Journal of assisted reproduction and genetics, 1998. **15**(2): p. 62-64.
106. Liu, Y., C. Jones, and K. Coward, *The Current Practice of Assisted Hatching for Embryos in Fertility Centres: a General Survey*. Reproductive Sciences, 2022: p. 1-10.
107. Martins, W.P., et al., *Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Human reproduction update, 2011. **17**(4): p. 438-453.
108. Rufas-Sapir, O., et al., *Is assisted hatching beneficial in patients with recurrent implantation failures? Age*, 2004. **35**: p. 4.

109. Sciorio, R., et al., *Blastocyst collapse as an embryo marker of low implantation potential: a time-lapse multicentre study*. Zygote, 2020. **28**(2): p. 139-147.
110. Togashi, K., et al., *Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2015. **32**(6): p. 969-976.
111. Navarro, A., et al., *Aula Joven*.
112. Bodri, D., et al., *Blastocyst collapse is not an independent predictor of reduced live birth: a time-lapse study*. Fertility and sterility, 2016. **105**(6): p. 1476-1483. e3.
113. Marcos, J., et al., *Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study*. Human Reproduction, 2015. **30**(11): p. 2501-2508.
114. Borja Jiménez, P., *Revisión de la evolución de los Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos*. 2021.
115. Harper, J., et al., *Adjuncts in the IVF laboratory: where is the evidence for 'add-on' interventions?* Human Reproduction, 2017. **32**(3): p. 485-491.
116. Tejera, A., et al., *ASSISTED HATCHING (AH) IN COLLAPSED BLASTOCYSTS IS ABLE TO RESTORE THE IMPLANTATION RATES: A RETROSPECTIVE STUDY*. Fertility and Sterility, 2020. **114**(3): p. e117.
117. Ardoy, M., et al., *Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos*. Cuadernos de embriología clínica, 2008. **2**: p. 1-59.
118. Endo, Y., et al., *Laser-assisted hatching on clinical and neonatal outcomes in patients undergoing single vitrified Blastocyst transfer: A propensity score–matched study*. Reproductive Medicine and Biology, 2021. **20**(2): p. 182-189.
119. Elnahas, A., et al., *The use of laser assisted hatching of frozen/thawed embryos versus laser assisted hatching of fresh embryos in human intracytoplasmic sperm injection*. Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2018. **38**(5): p. 729-729.

120. Ng, C., et al., *Assisted hatching of vitrified-warmed blastocysts prior to embryo transfer does not improve pregnancy outcomes*. Journal of Ovarian Research, 2020. **13**(1): p. 1-8.
121. Geng, L., et al., *Laser-assisted hatching zona thinning does not improve the pregnancy outcomes of poor-quality blastocysts in frozen-thawed embryo transfer cycle: a retrospective cohort study*. Lasers in Medical Science, 2022. **37**(3): p. 1605-1614.
122. Sanmee, U., W. Piromlertamorn, and T. Vutyavanich, *A randomized trial of partial versus complete versus not using laser-assisted hatching in vitrified-warmed cleavage embryo transfer: a preliminary report*. JOURNAL OF THE MEDICAL ASSOCIATION OF THAILAND, 2021. **104**(1): p. 18-23.
123. Knudtson, J.F., et al., *Assisted hatching and live births in first-cycle frozen embryo transfers*. Fertility and sterility, 2017. **108**(4): p. 628-634.
124. Sciorio, R. and M. Meseguer, *Focus on time-lapse analysis: blastocyst collapse and morphometric assessment as new features of embryo viability*. Reproductive BioMedicine Online, 2021. **43**(5): p. 821-832.
125. Sciorio, R., K. Thong, and S.J. Pickering, *Spontaneous blastocyst collapse as an embryo marker of low pregnancy outcome: A Time-Lapse study*. JBRA Assisted Reproduction, 2020. **24**(1): p. 34.
126. Le Verge-Serandour, M. and H. Turlier, *A hydro-osmotic coarsening theory of biological cavity formation*. PLoS computational biology, 2021. **17**(9): p. e1009333.
127. Cimadomo, D., et al., *Human blastocyst spontaneous collapse is associated with worse morphological quality and higher degeneration and aneuploidy rates: a comprehensive analysis standardized through artificial intelligence*. Human Reproduction, 2022.
128. Wyns, C., et al., *ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE*. Human reproduction open, 2022. **2022**(3): p. hoac022.
129. Zhang, L., et al., *Thinning or Opening: A Randomized Sibling-Embryo Pilot Trial on the Efficacy of Two Laser-Assisted Hatching Modes During the Extended Culture of Highly Fragmented Cleavage Embryos*. Frontiers in Endocrinology, 2022. **13**.

130. Le, M.T., et al., *Thinning and drilling laser-assisted hatching in thawed embryo transfer: A randomized controlled trial*. Clinical and experimental reproductive medicine, 2018. **45**(3): p. 129.
131. Lee, J.-W., et al., *Effects of laser-assisted thinning versus opening on clinical outcomes according to maternal age in patients with repeated implantation failure*. Lasers in Medical Science, 2019. **34**(9): p. 1889-1895.
132. Ng, E.H.Y., et al., *Randomized double-blind comparison of laser zona pellucida thinning and breaching in frozen–thawed embryo transfer at the cleavage stage*. Fertility and sterility, 2008. **89**(5): p. 1147-1153.
133. Mantoudis, E., et al., *A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients*. Human Reproduction, 2001. **16**(10): p. 2182-2186.
134. Schimmel, T., et al., *Laser-assisted zona pellucida thinning does not facilitate hatching and may disrupt the in vitro hatching process: a morphokinetic study in the mouse*. Human Reproduction, 2014. **29**(12): p. 2670-2679.
135. Valkova, L., et al. *Combined Artificial Collapse and Assisted Hatching Increase the Success Rate in Frozen Embryo Transfer*. in *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences*. 2022.